

**Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten**

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber



**Hemmung der Fc-Rezeptor-(FcγRIIA)-Aktivierung auf
Thrombozyten durch Btk-Inhibitoren:**

**Eine neue Option für die Behandlung der Heparin-
induzierten Thrombozytopenie?**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde an
der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München**

vorgelegt von
Luise Goldmann
aus Erlangen

2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Schulz
Priv. Doz. Dr. Peter Düwell

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Heparin-induzierte Thrombozytopenie.....	1
1.1.1	Heparin	1
1.1.2	Krankheitsbild der Heparin-induzierten Thrombozytopenie.....	2
1.2	FcγRIIA-Rezeptor.....	6
1.2.1	Fc-Rezeptoren auf Blutzellen	6
1.2.2	Struktur des FcγRIIA (CD32a).....	8
1.3	Thrombozytenaktivierung und Hämostase	9
1.3.1	Stimuli und Signalwege der Thrombozytenaktivierung	11
1.3.2	P-Selektin vermittelte thrombozytäre Zellinteraktionen	12
1.3.3	FcγRIIA-induzierte Thrombozytenaktivierung und Signalweg	13
1.3.4	Spontanaggregation	16
1.4	Btk-Inhibitoren	17
1.4.1	Brutons Tyrosin Kinase	17
1.4.2	Irreversible Btk-Inhibitoren.....	18
1.4.3	Reversible Btk-Inhibitoren	21
2	Fragestellung.....	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Chemikalien	24
3.2	Geräte	26
3.3	Sonstige Materialien.....	27
3.4	Methoden	27
3.4.1	Blutabnahme	27
3.4.2	Multiplate® (Messung der Thrombozytenaggregation im Blut)	27
3.4.3	Messung der ATP-Sekretion	29
3.4.4	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS).....	31
3.4.5	<i>Platelet function analyzer</i> PFA-200® (Bestimmung der <i>in vitro</i> Verschlusszeit)	35
3.4.6	Statistische Auswertung	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Fc-Rezeptor vermittelte Thrombozytenaktivierung durch CD32 <i>cross-linking</i> und CD9-Antikörper	37
4.2	Hemmung der Fc-Rezeptor vermittelten Thrombozytenaggregation im Blut durch die irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059 (Tirabrutinib), BGB-3111 (Zanubrutinib) und Evobrutinib und durch den reversiblen Btk-Inhibitor GDC-0853 (Fenebrutinib)	39

4.3	Einfluss der Inkubationszeit des Blutes mit Btk-Inhibitoren auf die Hemmung der Fc-Rezeptor vermittelten Thrombozytenaggregation	46
4.4	Wirkung von Btk-Inhibitoren auf die Fc-Rezeptor vermittelte thrombozytäre ATP-Sekretion und P-Selektin-Expression sowie die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen	48
4.5	Wirkung von Btk-Inhibitoren auf die durch HIT-Serum induzierte Thrombozytenaggregation.....	52
4.6	Wirkung der oralen Einnahme einer Einzeldosis Ibrutinib auf die Fc-Rezeptor-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	57
4.7	Hemmung der Spontanaggregation (SPA) durch CD32-Antikörper, Btk-Inhibitoren und humane Fc-IgG Antikörper	63
5	Diskussion.....	67
5.1	Fc-Rezeptor-induzierte Thrombozytenaktivierung, Btk-Inhibitoren und Heparin-induzierte Thrombozytopenie	67
5.2	Fc-Rezeptor vermittelte thrombozytäre Spontanaggregation im Blut	75
6	Klinische Relevanz.....	77
7	Zusammenfassung.....	79
8	Literaturverzeichnis	81
	Abkürzungen	95
	Publikation im Rahmen dieser Dissertation	99
	Danksagung.....	100
	Eidesstattliche Versicherung	101

1 Einleitung

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist zwar eine gut verstandene, allerdings noch nicht optimal therapierbare Erkrankung. Ihre Erkennung und unter Umständen lebensbedrohliches Krankheitsbild sowie die komplexe Pathogenese stellen nach wie vor Probleme bei der Behandlung dar. Eine neue oder ergänzende Therapie wäre sehr wünschenswert.

1.1 Heparin-induzierte Thrombozytopenie

1.1.1 Heparin

Heparin ist ein auch physiologisch im Körper vorkommendes Glykosaminoglykan welches in basophilen Granulozyten und Mastzellen synthetisiert wird (Martin und Resch 2009). Es wirkt gerinnungshemmend indem es die Aktivität des Antithrombin (AT) verstärkt. AT ist ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 65kDa. Es wirkt als Protease-Inhibitor und hemmt die Gerinnungsfaktoren IXa, Xa (*tissue factor*) und Thrombin, drei wichtige Bestandteile der Blutgerinnung, indem es irreversibel an deren aktive Zentren bindet (Possinger und Regierer 2011; Lüllmann et al. 2016). Faktor IXa und Xa sind Teile des Prothrombin-Aktivator-Komplexes, welcher Prothrombin in Thrombin umwandelt. Thrombin hat mehrere Wirkungen in der Hämostase, so führt es zur Thrombozytenaktivierung und Fibrinbildung, welche eine Stabilisierung des in der primären Hämostase gebildeten Thrombus bewirkt (Versteeg et al. 2013). Heparin beschleunigt die Anlagerung des AT an das Thrombin. Es bindet brückenartig über seine Pentasaccharid-Einheiten an die positiv geladene Lysin-Gruppen des AT und an Thrombin.

Heparin ist eines der effektivsten Antikoagulanzen und wird immer noch häufig allgemein verwendet bei der postoperativen Prophylaxe tiefer Beinvenenthrombosen und bei der Therapie venöser Thrombosen, Embolien und der Verbrauchs-koagulopathie (Lüllmann et al. 2016; Possinger und Regierer 2011).

Zur Behandlung stehen unfractioniertes Heparin (UFH) und niedermolekulares (*low molecular weight*) Heparin (LMWH) zur Verfügung (Martel et al. 2005). UFH ist sehr heterogen und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 15kDa. Therapeutisches Heparin wird aus der intestinalen Mukosa von Schweinen und Rindern gewonnen. Bei der niedrig dosierten Thromboseprophylaxe werden Einzeldosen von 5000 I.E. zwei- bis dreimal pro Tag subkutan injiziert. Die

therapeutische Dosis beträgt 20000–40000 I.E. pro Tag und wird mittels einer Dauerinfusion intravenös appliziert. Da UFH durch Protamin antagonisierbar ist, wird es beispielsweise auch bei Herzoperationen eingesetzt, damit die Gerinnungshemmung anschließend wieder aufgehoben werden kann.

Da bei der Thromboseprophylaxe mit UFH die partielle Thromboplastinzeit (PTT) engmaschig kontrolliert werden muss, um Blutungen vorzubeugen, wurde LMWH entwickelt, welches homogener ist und weniger variable antikoagulierende Wirkungen zeigt als UFH. Eine Messung der PTT bei der Thromboseprophylaxe ist hier nicht nötig (Hirsh et al. 2001). LMWH wird aus UFH durch Fraktionierung gewonnen und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von nur 5kDa. Es weist eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit auf als UFH und wird zur Thromboseprophylaxe in Dosen von 20-40 mg ein- bis zweimal täglich subkutan injiziert. In wesentlich höherer Dosierung ist es außerdem zur Therapie venöser Thrombosen anwendbar. Im Vergleich zu UFH ist LMWH schlechter durch Protamin antagonisierbar (Lüllmann et al. 2016; Possinger und Regierer 2011; Reichl et al. 2014).

1.1.2 Krankheitsbild der Heparin-induzierten Thrombozytopenie

Eine unerwünschte Nebenwirkung des Heparins ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) (Walenga et al. 2003). Sie ist die häufigste medikamenten-assoziierte Thrombozytopenie und Thromboseerkrankung und betrifft 5-7% der Patienten, die eine Heparin-Therapie oder Prophylaxe erhalten (Look et al. 1997; Reilly et al. 2001; McKenzie und Sachais 2014).

Es können zwei Formen von HIT unterschieden werden. Zum einen gibt es die nicht-immunologische Typ I Form, zum anderen die immunologisch-vermittelte Typ II Form. Bei beiden Formen kommt es zu einer Thrombozytopenie.

Die Typ I Form beruht auf der Bindung und Wirkung von Heparin auf Thrombozyten. Deren Aktivierung führt zu einem geringen Abfall der Thrombozytenzahl, welche bereits wenige Minuten bis zwei Tage nach Heparin-Gabe auftritt. Nach Absetzen des Heparins normalisiert sich die Thrombozytenzahl von alleine, daher ist bei dieser Form der HIT keine Therapie notwendig (Arepally 2017; Fathi 2018).

Die HIT vom Typ II tritt für gewöhnlich ab dem fünften Tag nach Beginn der Heparin-Gabe auf (Reilly et al. 2001; McKenzie und Sachais 2014; Look et al. 1997). Deren Häufigkeit wird mit 0,2-3 % angegeben (Arepally 2017).

In gesunden Individuen ist die Immunreaktion in Form von Bildung HIT-spezifischer, gegen den Heparin/Plättchenfaktor-4-Komplex gerichteten Antikörper sehr selten (0,3-0,5%). Bei der prophylaktischen Gabe von UFH bilden sich bei 8-17% der Patienten anti-Heparin/Plättchenfaktor-4 Antikörper, bei LMWH und Fondaparinux dagegen nur bei 2-8% (Warkentin et al. 1995; Greten et al. 2010; Arepally 2017). Auch die klinische Manifestation der Erkrankung liegt bei UFH mit 2,6% höher als bei LMWH mit 0-0,2% (Martel et al. 2005; Arepally 2017). Dieser Unterschied gilt jedoch nicht bei therapeutischen Dosierungen, hier ist das Risiko bei UFH (1,5%) und LMWH (1,2%) annähernd gleich groß (Arepally 2017). Dies könnte daran liegen, dass bei der therapeutischen intravenösen Gabe aufgrund der kürzeren Kettenlänge von LMWH eine relative höhere Konzentration als bei UFH vorhanden sein muss, welche dann mit PF4 Komplexe bilden kann (Rauova et al. 2005).

Etwa 95% aller Patienten mit einer HIT vom Typ II zeigen eine Thrombozytopenie. Diese ist definiert als Abfall der Thrombozytenzahl auf unter 50% des Ausgangswertes oder eine totale Abnahme auf weniger als $100 \times 10^9/L$ fünf bis zehn Tage nach Beginn der Heparin-Therapie. Normalerweise ist dieser Abfall nach Absetzen des Heparins reversibel und kehrt bei etwa 65% der Patienten innerhalb einer Woche zum Ausgangswert zurück (Martel et al. 2005; Arepally 2017). Trotz der Thrombozytopenie sind Blutungen selten (Look et al. 1997) und nur bei 20-50% der Patienten mit nachgewiesenen HIT-Antikörpern kommt es zur Entwicklung von venösen und arteriellen Thrombosen (Arepally 2017). Diese sind für die hohe Mortalitätsrate von etwa 20% bei dieser Krankheit verantwortlich (Martel et al. 2005; Greten et al. 2010; Rauova et al. 2005). Neben der Abnahme der Thrombozytenzahl ist für die Diagnose einer HIT auch der Nachweis HIT-spezifischer Antikörper durch Labortests nötig (s.u.).

Viele unterschiedliche Faktoren sind an der Entstehung von HIT Typ II (im weiteren HIT bezeichnet) beteiligt und obwohl die Pathogenese dieser Erkrankung grundsätzlich bekannt ist, werden trotzdem fortlaufend neue Erkenntnisse gewonnen (Greinacher A, 2005). Bei der Erkrankung kommt es zu einer Bildung von IgG-Antikörpern durch B-Lymphozyten (Greinacher 2015b), die gegen den Heparin/Plättchenfaktor-4-Komplex (H/PF4) gerichtet sind (Amiral et al. 1995). PF4 ist ein positiv geladenes Thrombozyten-Chemokin. Es wird in Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten, gebildet und in deren Alpha-Granula gespeichert.

Das Protein hat eine Masse von 7,8kDa (Zucker und Katz 1991) und wird nach Aktivierung aus den Thrombozyten freigesetzt. Unter anderem bindet es an negativ geladene Glykosaminoglykane (GAGs) auf Endothelzellen und hemmt gebundenes AT, wodurch es ein prothrombotisches Milieu begünstigt. Es hat ebenfalls eine hohe Affinität für die negativ geladenen Pentasaccharidketten von Heparin, wodurch es zu der Bildung von H/PF4-Komplexen kommt. Diese Komplexe binden an B-Lymphozyten, die wiederum über den Komplementrezeptor CD21 Komplement-opsonierte Antigene binden und daraufhin Antikörper produzieren (Arepally 2017). Die Immunkomplexe, bestehend aus IgG und H/PF4-Ketten, binden auch an Thrombozyten, und zwar über den Fc-Teil des IgG an deren Rezeptor FcγRIIA (CD32a), was sie für Phagozyten wie Monozyten und Neutrophile opsoniert. Letztere phagozytieren die Zellen mit gebundenen Immunkomplexen, was teilweise den Abfall der Thrombozytenzahl erklärt (Huang et al. 2011; Rollin et al. 2016). Die Thrombozyten werden hauptsächlich in der Milz, aber auch in Lunge und Leber abgebaut (Hick und Hick 2013). Außerdem aktivieren die H/PF4-Immunkomplexe durch *cross-linking* des FcγRIIA die Thrombozyten, wodurch eine Thrombozytenaktivierung ausgelöst wird, und der dadurch sezernierte PF4 in einem positiven *feed-back* die Antikörperbildung weiter verstärkt. Die Thrombozytenaktivierung begünstigt die Entstehung von Thrombosen (Warkentin et al. 1994; Reilly et al. 2001; Arepally 2017) und der damit einhergehende intravaskuläre Thrombozytenverbrauch trägt weiterhin zum Abfall der Thrombozytenzahl bei (Greinacher 2015b). Der thrombozytäre FcγRIIA steht daher im Zentrum der Pathogenese von HIT.

Auch Monozyten und neutrophile Granulozyten verfügen über einen FcγRIIA und weitere Fc-Rezeptoren, welche durch die HIT-Antikörper aktiviert werden. Die Aktivierung von Monozyten ist assoziiert mit der Bildung des *tissue factor* (TF, Faktor X) und Mikropartikeln, welche die Thrombin-Bildung erhöhen, und die Thromboseneigung begünstigen (Rollin et al. 2016; Tutwiler et al. 2016; Perdomo et al. 2019).

Da die klinische Diagnose von HIT nicht leicht und häufig nicht eindeutig ist, gibt es verschiedene Scoring-Systeme, von denen sich besonders der 4T-score nach Warkentin bewährt hat. Hierbei werden den vier Parametern **Thrombozytopenie**, **Timing of platelet count fall**, **Thrombosen** und **exclusion of oTher causes**

entsprechend ihrer Ausprägung Punktwerte zugeteilt und anhand der Gesamtpunktzahl das Risiko einer bestehenden HIT abgeschätzt (Cuker et al. 2012). Ohne eine labormedizinische Bestätigung kann die Diagnose einer HIT jedoch nicht gestellt werden (Arepally 2017). Es gibt unterschiedliche Labortests, mit deren Hilfe eine HIT nachgewiesen werden kann. Man unterscheidet zwischen Immunoassays und Thrombozyten-Aktivierungs-Tests (sogenannten Funktionstests).

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) erfasst die H/PF4-IgG Antikörper im Patientenserum (Elalamy et al. 2009). Er ist einfach in der Durchführung und hat eine hohe Sensitivität (>90%), jedoch eine geringe Spezifität (30-70%). Weitere Beispiele für immunologische Tests, die jedoch seltener zur Erkennung einer HIT eingesetzt werden, sind der *Western Blot* und der *enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISpot) (Perdomo et al. 2019; Selleng et al. 2010).

Nur ein Teil der durch die HIT generierten H/PF4-IgG-Antikörper ist in der Lage durch *cross-linking* den Fc-Rezeptor der Thrombozyten zu aktivieren. Die geringere Spezifität immunologischer Tests ist scheinbar darauf zurückzuführen, dass einige Patienten bei Heparin-gabe niedrig-affine Antikörper bilden, die keine Thrombozytenaktivierung herbeiführen (Arepally et al. 1995).

Von den Funktionstests ist der frühere Goldstandard der *Serotonin-Release-Assay* (SRA). Hier wird nach Zugabe von HIT-Serum und niedrigen Heparin-Konzentrationen die Freisetzung von radiomarkiertem ^{14}C -Serotonin aus den dichten Granula von gewaschenen Spenderthrombozyten gemessen (Warkentin et al. 1992; Eke und May 2018; Look et al. 1997). Er hat eine höhere Spezifität als der ELISA-Test (>95%), ist aber technisch aufwändiger, da die Spender-Thrombozyten mit radioaktivem Serotonin markiert werden müssen. Er wird daher nicht routinemäßig durchgeführt (Arepally 2017).

Im Idealfall sollten sowohl ELISA als auch SRA durchgeführt werden, um die Sensitivität zu steigern (Slavik et al. 2015).

Eine weitere Möglichkeit eine HIT nachzuweisen ist die *multiple electrode aggregometry* (MEA) (Abschnitt 3.4.2). MEA liefert ähnlich verlässliche Ergebnisse wie der SRA, hat aber erhebliche Vorteile. So ist sie einfacher in der Handhabung, da Blut für die Messung verwendet wird, und die Thrombozyten nicht markiert werden müssen. Dieser Test ist daher viel schneller und auch kostengünstiger als der SRA (Morel-Kopp et al. 2010; Minet et al. 2017; Elalamy et al. 2009; Morel-Kopp et al. 2012; Morel-Kopp et al. 2016; Galea et al. 2013; Jin et al. 2019).

Es ist entscheidend, eine HIT früh zu erkennen und das Heparin abzusetzen, sobald die Diagnose gestellt ist, da es bei weiterer Gabe von Heparin zu schweren thrombotischen Komplikationen kommen kann (Laster et al. 1987).

Nach frühestmöglichem Absetzen des Heparins ist es wichtig, andere Antikoagulanzen einzusetzen, um drohende Thrombosen abzuwenden beziehungsweise bestehende Thrombosen zu behandeln. Wenn eine langfristige Antikoagulation angestrebt wird, werden vor allem orale Vitamin-K-Antagonisten (VKAs, z.B. Warfarin) verabreicht. Vorher ist allerdings eine Erholung der Thrombozytenzahl abzuwarten, da in der akuten Phase einer HIT das Risiko einer Warfarin-induzierten Mikrothrombosebildung besteht. Direkte orale Antikoagulanzen (DOACs) sind aktuell die bevorzugte Therapieoption, falls rascher Handlungsbedarf notwendig ist. Zu ihnen gehören unter anderem die direkten Faktor-Xa-Hemmer Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban sowie der direkte Thrombin-Hemmer Dabigatran. Die Vorteile der DOACs gegenüber VKAs liegen darin, dass es nicht zu negativen immunologischen Wechselwirkungen mit den HIT-Antikörpern kommt und dass sie außerdem einen schnelleren Wirkbeginn zeigen, ohne die natürliche antikoagulatorische Wirkung von Protein C zu hemmen. Damit sind sie auch in der akuten Phase der HIT einsetzbar (Warkentin et al. 2017).

1.2 FcγRIIA-Rezeptor

Der thrombozytäre FcγRIIA-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer HIT und gehört zur Familie der Fc-Rezeptoren, welche den Fc-Teil von Immunglobulinen binden.

1.2.1 Fc-Rezeptoren auf Blutzellen

Auf den meisten Zellen des Immunsystems befinden sich Fc-Rezeptoren. Sie sind spezifisch für eine bestimmte Antikörperklasse, so binden Fcγ-Rezeptoren beispielsweise nur Immunglobulin G (IgG) und Fcε-Rezeptoren nur IgE. Hoch-affine FcRs sind in der Lage einzelne Antikörper zu binden, während niedrig-affine FcRs nur Immunkomplexe bestehend aus mehreren Antikörpern binden können (Daëron 1997; Futosi et al. 2013). Einer dieser Rezeptoren ist der niedrig-affine FcγRIIA, der auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird. Außerdem ist er der einzige Fc-Rezeptor auf Thrombozyten (Berlacher et al. 2013;

Arman und Krauel 2015; Qiao et al. 2015). Thrombozyten exprimieren 1000-4000 dieser Fc-Rezeptoren pro Zelle (Qiao et al. 2015).

Neutrophile Granulozyten exprimieren verschiedene Fc-Rezeptoren, die wichtigsten sind hierbei die Fc γ -Rezeptoren, welche IgG binden. Die Rezeptoren niedriger Affinität sind Fc γ RII. Der Fc γ RIIA (CD32a) führt durch Bindung von Immunkomplexen zur Zellaktivierung. Im Rahmen einer HIT können Neutrophile entweder von den HIT-Immunkomplexen direkt über den Fc γ RIIA, oder durch die Bindung aktivierter Thrombozyten via P-Selektin und P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) aktiviert werden, was die Thrombosewahrscheinlichkeit erhöht (siehe Abschnitt **1.3.2**) (Perdomo et al. 2019). Dagegen hat die Aktivierung des Fc γ RIIB eine Zell-inhibitorische Wirkung und reguliert den Fc γ RIIA negativ (Futosi et al. 2013). Zu den hoch-affinen FcRs zählen Fc γ RI, der nur auf bereits aktivierten Neutrophilen auftritt, sowie IgE-bindende Fc ϵ RI und Fc ϵ RII, deren Rolle bisher jedoch unbekannt ist. Fc α RI, ein weiterer hoch-affiner FcR, ist mit der γ -Kette der Fc γ Rs assoziiert und bindet monomeres Serum IgA (Futosi et al. 2013; Rollin et al. 2016)

Auch auf Monozyten und Makrophagen sind Fc γ RIIA und Fc γ RIIIA zu finden, die ebenfalls durch *cross-linking* von Immunkomplexen zur Aktivierung der Monozyten führen, sowie der der inhibitorisch wirksame Fc γ RIIB. Die Aktivierung von Fc γ RI und vor allem Fc γ RIIA auf Monozyten durch HIT-Antikörper führt zu einer gesteigerten TF-Synthese, Bildung prokoagulanter Mikropartikel und vermehrter Thrombin-Bildung (Rollin et al. 2016; Tutwiler et al. 2016).

Die Fc γ Rs auf dendritischen Zellen ermöglichen vor allem eine spezifische CD4-T-Zell-Aktivierung. Der genaue Aktivierungsweg über Fc γ Rs ist zwar unbekannt, aber generell erhöhen aktivierende Fc γ Rs, wie Fc γ RI, Fc γ RIIA und Fc γ RIII, die Antigen-Präsentation von Immunkomplexen. Auch hier wirkt Fc γ RIIB diesem Prozess regulierend entgegen (Guilliams et al. 2014).

Fc γ Rs treten des Weiteren auch auf basophilen und eosinophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen und Mastzellen auf, die bei der HIT-Pathogenese aber bisher nicht untersucht wurden (Rollin et al. 2016; Zhi et al. 2013).

1.2.2 Struktur des FcγRIIA (CD32a)

Der FcγRIIA ist wie alle bekannten FcγRIIs ein *low-affinity* Rezeptor, der nur eine niedrige Affinität gegenüber monomeren IgG-Molekülen hat, dafür aber eine hohe Affinität für IgG-Komplexe (Fridman 1991; Arman und Krauel 2015; Bruhns et al. 2009). Der Rezeptor ist ein *single-chain*-Rezeptor mit einem extrazellulären, einem kurzen transmembranen und einem intrazellulären Teil (**Abb. 1**).

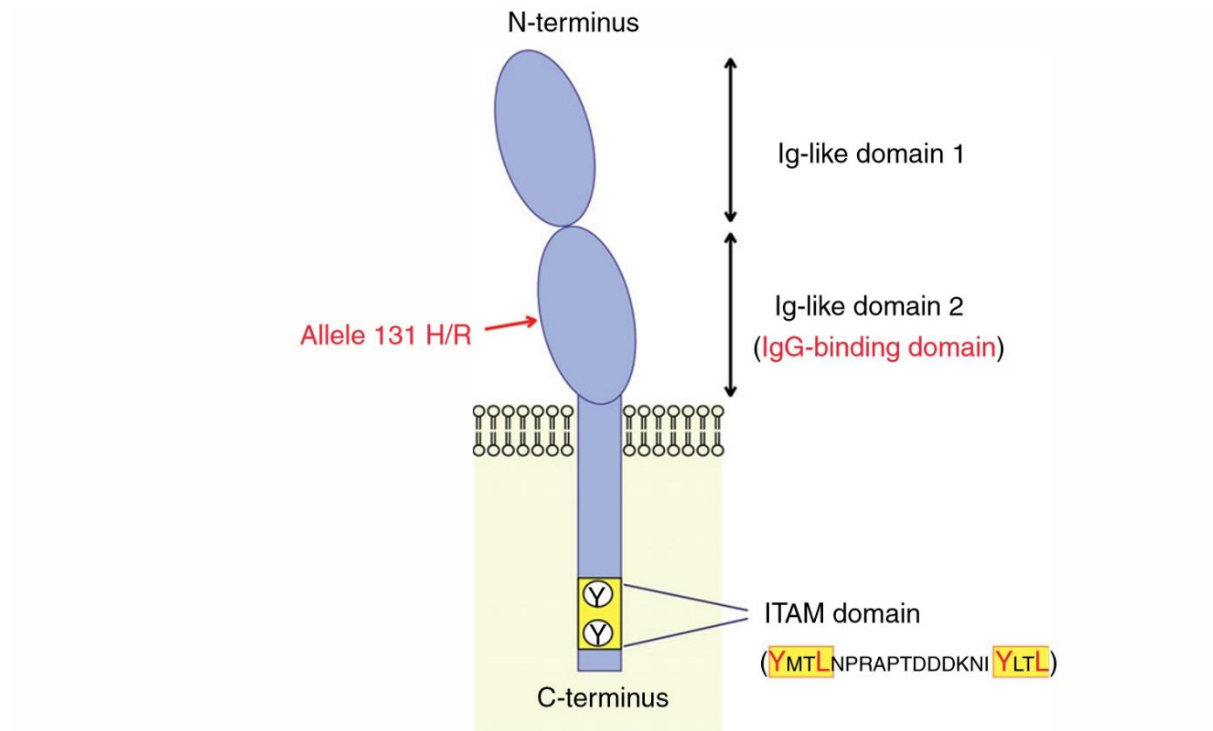


Abb. 1: Struktur des FcγRIIA. ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, Ig: Immunglobulin. (Abbildung aus Arman und Krauel 2015 reproduziert mit Erlaubnis des Herausgebers des *Journal of Thrombosis and Haemostasis*).

Der extrazelluläre Teil besteht aus zwei zu dem Fc-Teil von IgG homologen Domänen. Diese C-Domänen sind beim FcγRIIA jedoch kürzer als bei den IgG (ca. 86 versus ca. 110 Aminosäurereste). Die membranseitige C-Domäne ist für die Bindung von IgG verantwortlich, wobei es Unterschiede in seiner Fähigkeit IgG zu binden gibt.

Beim Menschen sind mehrere Polymorphismen des FcγRIIA-Rezeptors bekannt, welche dessen Fähigkeit IgG zu binden beeinflussen und auch ein Faktor für das Auftreten einer HIT zu sein scheinen (Slavik et al. 2015; Trist et al. 2014). Ein gut erforschter Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) im vierten der acht Exons des FCGR2A-Gens, welcher zur Substitution von Arginin

(Arg-131) durch Histidin führt (His-131), steigert seine Bindungsfähigkeit für IgG im Gegensatz zu Arg-131, welches eine niedrigere Bindungsaffinität hat (Arman und Krauel 2015; Rollin et al. 2016). Mehrere Studien haben ergeben, dass paradoxerweise der Arg/Arg-131 Genotyp besonders häufig bei Patienten mit HIT-induzierten Thrombosen nachzuweisen ist (Rollin et al. 2016). Es scheint, dass der Fc-Rezeptor vom Arg/Arg-131 Genotyp mit einer höheren Empfindlichkeit der Thrombozyten für verschiedene Stimuli einhergeht (Clancy et al. 2019) und dass Spender mit diesem Genotyp häufiger positiv auf HIT-Seren ansprechen, als Spender mit dem Arg/His-131 Genotyp oder His/His-131 Genotyp (Morel-Kopp et al. 2012; Slavik et al. 2015).

Der intrazelluläre Teil besitzt ein für Immunrezeptoren charakteristisches *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) (Indik et al. 1992). ITAMs enthalten eine kurze Aminosäuresequenz, die wiederum aus zwei YXXL/I-Sequenzen besteht, die durch sechs bis acht Aminosäurereste voneinander getrennt sind (hierbei steht Y für Tyrosin, L für Leucin, I für Isoleucin und X für eine beliebige Aminosäure) (Isakov 1997). Beim FcγRIIA ist diese ITAM Sequenz allerdings atypisch, da sie zwischen den charakteristischen YXXL/I Sequenzen zwölf anstatt nur sechs bis acht Aminosäuren aufweist (Daëron 1997).

1.3 Thrombozytenaktivierung und Hämostase

Die Hämostase ist ein äußerst komplexer, aber gut erforschter Vorgang und dient der Abdichtung verletzter Gefäße zur Vermeidung hoher Blutverluste (Klinke et al. 2010). Sie ist die Hauptfunktion von Thrombozyten.

Während der primären Hämostase binden die Thrombozyten entweder über die Glykoproteine GPIa/IIa oder GPVI direkt an das Kollagen der verletzten Gefäßwand oder über GPIb an den von-Willebrand-Faktor (vWF), welcher an Kollagen bindet. Der vWF wird von Endothelzellen gebildet und/oder stammt nach Verletzung der Gefäßwand aus dem Plasma (Watson et al. 2010). Nach Adhäsion an diese Matrixproteine werden die Thrombozyten aktiviert, wodurch es zur Sekretion und Freisetzung verschiedener Substanzen, Formveränderung und Aggregation der Thrombozyten kommt (Stalker et al. 2012; Hick und Hick 2013; Klinke et al. 2010). Zu den Mediatoren, die aus den Thrombozyten freigesetzt werden und zu einer autokrinen Verstärkung der Thrombozytenaktivierung beitragen, gehört Thromboxan A₂ (TxA₂), welches aus von Phospholipiden freigesetzter Arachidonsäure

synthetisiert wird. Außerdem werden ADP, ATP, und Serotonin aus den dichten Granula sezerniert, wobei ADP der wichtigste Verstärker der Thrombozytenaktivierung ist. Die Aktivierung spezifischer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) durch TxA₂ und ADP führt zur Stimulation der Phospholipase C β und es kommt zur Bildung von Diglycerid und Inositoltrisphosphat (IP₃), woraufhin die Proteinkinase C aktiviert wird beziehungsweise die zytosolische Ca²⁺-Konzentration ansteigt. Diese intrazellulären Signalwege führen letztlich zur Thrombozytenaktivierung: Formwandel, Sekretion und Aggregation (Siess 1989). Des Weiteren werden aus den α -Granula GPIIb/IIIa und P-Selektin sezerniert, welche auf die Oberfläche der Thrombozyten transloziert werden, sowie Fibrinogen, verschiedene Gerinnungsfaktoren und der Plättchenfaktor 4 (PF4) (siehe Abschnitt 1.1.2) (Jurk und Kehrel 2010; Arman und Krauel 2015).

Durch *inside-out signaling* (Proteinkinase-C-Aktivierung, Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺) kommt es zur Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors GPIIb/IIIa (auch Integrin α IIb β 3) (Moroi und Watson 2015), woraufhin dieser das im Plasma in hoher Konzentration vorhandene Fibrinogen bindet. Dadurch kommt es zur Brückenbildung zwischen den Thrombozyten, der sogenannten Thrombozyten-aggregation, welche reversibel sein kann, aber irreversibel wird, wenn gleichzeitig die Thrombozyten-sekretion stimuliert wird (Hick und Hick 2013).

In der sekundären Hämostase wird über das intrinsische und das extrinsische System, an denen verschiedenste Gerinnungsfaktoren beteiligt sind, der Prothrombin-Aktivator-Komplex gebildet, der Prothrombin in Thrombin umwandelt (Versteeg et al. 2013). Thrombin hat eine Vielzahl von Funktionen. Vor allem aktiviert es Thrombozyten und rekrutiert zirkulierende Thrombozyten in das wachsende Thrombozytenaggregat. Es stimuliert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, welches das Thrombozytenaggregat stabilisiert. Außerdem aktiviert es das kontraktile Aktin-Myosin-System, wodurch sich die Thrombozyten kontrahieren und sich der Thrombus zusammenzieht (Retraktion) (Stalker et al. 2012; Klinke et al. 2010; Fallon et al. 2007).

Auf einige für diese Arbeit wichtige Thrombozytenstimuli und deren Signalwege, die zur Thrombozytenaktivierung führen, soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.3.1 Stimuli und Signalwege der Thrombozytenaktivierung

1.3.1.1 Thrombin und TRAP

Ein sehr starker Thrombozyten-Stimulus ist Thrombin, welches die Thrombozyten vor allem über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) aktiviert. Thrombin verfügt über proteolytische Eigenschaften. Nach Bindung des Thrombins an den Rezeptor wird durch Proteolyse ein gebundener Ligand am extrazellulären Teil des Rezeptors freigelegt, welcher dann den Rezeptor aktiviert. Humane Thrombozyten exprimieren vier verschiedene PARs von denen drei durch Thrombin aktiviert werden (PAR-1, PAR-3 und PAR-4) (Andersen et al. 1999; Kahn et al. 1998). Durch die Aktivierung des PAR-1 und des PAR-4 kommt es gekoppelt über G_q -und $G_{12/13}$ -Proteine zur Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$) und wie oben beschrieben zur den intrazellulären Signalwegen, welche die Thrombozytenaktivierung (Formwandel, Sekretion und Aggregation) vermitteln. Das Thrombin-Rezeptor-aktivierende Peptid 6 (TRAP-6) entspricht einem Teil des proteolytisch freigelegten PAR-1 Liganden, und ist daher ein synthetischer Thrombin-Agonist, der an den PAR-1 Rezeptor bindet (Gremmel et al. 2010; Stalker et al. 2012).

1.3.1.2 ADP

ADP wird bei Thrombozytenaktivierung aus deren dichten Granula sezerniert. Es bindet zum einen an den $P2Y_{12}$ -Rezeptor auf der Thrombozyten Oberfläche, welcher an das G_i -Protein koppelt, der daraufhin die Adenylatcyclase inhibiert. Außerdem bindet es an den $P2Y_1$ G_q -gekoppelten Rezeptor, welcher zur Aktivierung der $PLC\beta$ und über intrazelluläre Signalwege (s.o.) zum Formwandel, Sekretion und Aggregation der Thrombozyten führt (Beck et al. 2017; Versteeg et al. 2013).

1.3.1.3 Arachidonsäure

Arachidonsäure (AA) ist eine hoch ungesättigte Omega-6-Fettsäure. Die Phospholipase A2 spaltet sie bei Thrombozytenaktivierung aus der C2-Position der Phospholipide der Zellmembran ab. Bei der Umwandlung von AA durch die mittels Aspirin hemmbare Cyclooxygenase 1 (COX-1) und die Thromboxan-Synthase entsteht TxA_2 (Kasmeridis et al. 2013). Dieses bindet an den G_q -Protein gekoppelten Thromboxan-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche, der bei Aktivierung, ähnlich dem PAR-1, über $PLC\beta$, PKC und IP_3 zur Thrombozytenaktivierung führt (Stalker et al. 2012; Klinke et al. 2010).

1.3.2 P-Selektin vermittelte thrombozytäre Zellinteraktionen

P-Selektin (auch CD62P) ist ein Molekül, das in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert und erst bei Thrombozytenaktivierung nach dessen Sekretion auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und hämatopoetische Vorläuferzellen besitzen den passenden Liganden PSGL-1 und können so an P-Selektin binden. Besondere Bedeutung hat dabei die Bindung von Thrombozyten P-Selektin an Monozyten und neutrophile Granulozyten.

Durch die Thrombozyten-Bindung an Monozyten werden deren adhäsive Eigenschaften erhöht. So wird die monozytäre Expression von β -Integrinen gesteigert, und dadurch die Adhäsion an Fibronektin und Endothelzellen erhöht. Außerdem wird die Zytokin-Produktion der Monozyten gesteigert, unter anderem die Sekretion des Tumornekrosefaktors (TNF α) (Thomas und Storey 2015).

Auch in Neutrophilen steigert die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 die Adhäsion ans Endothel. Außerdem bilden sich Thrombozyten-Neutrophil-Komplexe, welche eine erhöhte phagozytische Aktivität aufweisen und pro-inflammatorische Substanzen wie L-Selektin und reaktive Sauerstoffspezies abgeben. Des weiteren fördern Thrombozyten-Neutrophil-Komplexe die Fibrinbildung durch Verstärkung der Neutrophil-abhängigen Koagulation (Thomas und Storey 2015; Brühl et al. 2012). Diese können die Bildung von Thrombosen über unterschiedliche Mechanismen begünstigen. Zum einen übertragen die Neutrophilen *tissue factor* (TF) enthaltende Mikropartikel auf die Thrombozyten, wodurch die Fibrinbildung über das extrinsische System stimuliert wird (Lisman 2018; Brühl et al. 2012). Außerdem stimuliert die Thrombozyten-Neutrophilen Interaktion die Bildung neutrophiler extrazellulärer *traps* (NETs), aus neutrophiler DNA bestehende Netzwerke extrazellulärer Fasern, die über den Gerinnungsfaktor XII das intrinsische Koagulations-System aktivieren (Brühl et al. 2012) und die Thrombosebildung bei HIT begünstigen (Perdomo et al. 2019). Schließlich sezernieren die Neutrophilen verschiedene Oxidantien und Peptide, die das natürliche gerinnungshemmende System blockieren, indem unter anderem die Aktivität von AT und die Spaltung des vWF gehemmt werden (Pillai et al. 2016; Lisman 2018).

1.3.3 FcγRIIA-induzierte Thrombozytenaktivierung und Signalweg

FcγRIIA (CD32a) ist der einzige Fc-Rezeptor, der auf Thrombozyten vorkommt. Die extrazelluläre Aktivierung des FcγRIIA kann *in vitro* durch CD32 *cross-linking*, CD9-Antikörper und Immunkomplexe induziert werden.

Beim *cross-linking* bindet zunächst ein monoklonaler CD32-Antikörper mit seiner variablen Region (Fv) an den Rezeptor. Dies allein führt noch nicht zur Aktivierung, erst infolge der Vernetzung der Fc-Teile des primären Antikörpers durch F(ab')₂-Fragmente eines sekundären Antikörpers bildet sich ein FcγRIIA-cluster, das zur Rezeptoraktivierung führt (**Abb. 2A**) (Rosenfeld et al. 1985; Arman und Krauel 2015). Der Rezeptor kann auch von Immunkomplexen, wie den H/PF4-IgG Antikörper-Komplexen in Gegenwart von Heparin aktiviert werden, wie in Abschnitt 1.1.2 ausgeführt (Kelton et al. 1988; Greinacher 2015b). Hierbei binden die Fc-Regionen der IgG Immunkomplexe an den Rezeptor (**Abb. 2B**).

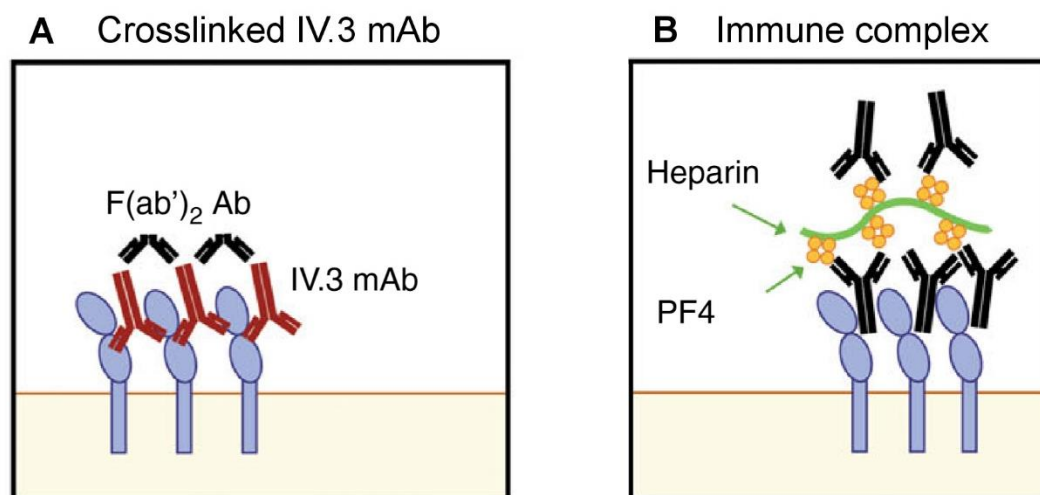


Abb. 2: Aktivierungswege des FcγRIIA-Rezeptors. (A) Aktivierung über CD32 *cross-linking*. IV.3 mAb: primärer monoklonaler CD32 Antikörper. F(ab')₂ Ab: Sekundärer Antikörper. **(B)** Aktivierung über Heparin/PF4 IgG Immunkomplexe. PF4: Plättchenfaktor 4. (Originalabbildung aus Arman und Krauel 2015 reproduziert mit Erlaubnis des Herausgebers des *Journal of Thrombosis and Haemostasis*).

Der thrombozytäre Signalweg nach Aktivierung des FcγRIIA-Rezeptors ähnelt der nach GPVI-Stimulation durch Kollagen und *collagen-related peptide* (Watson et al. 2010; Moroi und Watson 2015). Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer schnellen Phosphorylierung der ITAM-Tyrosine durch Rezeptor-assoziierte Src-Tyrosinkinasen, darunter Lyn (**Abb. 3**). Das an 2 Tyrosinen phosphorylierte ITAM

bindet die Tyrosinkinase p72/Syk über dessen tandem-SH2 Domäne. Die Aktivierung von Syk setzt eine Kaskade von weiteren Proteinphosphorylierungen, unter anderem von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-K), des Adapterproteins LAT und der Phospholipase $\text{C}\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) in Gang. PLC $\gamma 2$ bildet aus Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2), die sekundären Messenger 1,2-Diglycerid, welches die Proteinkinase C aktiviert, und IP3, welches aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} freisetzt (**Abb. 3**). Dies führt unter anderem zum *inside-out signaling* des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ Integrin (Fibrinogenrezeptor) und damit zur Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten, sowie zur Sekretion von Granula-Inhaltsstoffen wie ADP, P-Selektin (**Abb. 3**).

PI3-K konvertiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3). Durch die PIP_3 -Bindung an die PH-Domänen der homologen Tyrosinkinasen Btk und Tec kommt es zu deren Translokation an die Plasmamembran, woraufhin diese durch Lyn-vermittelte Phosphorylierung und Autophosphorylierung aktiviert werden (siehe Abschnitt 1.4.1, **Abb. 4**) (Lee und Bergmeier 2016; Pain et al. 2000; Arman und Krauel 2015; Moroi und Watson 2015; Oda et al. 2000).

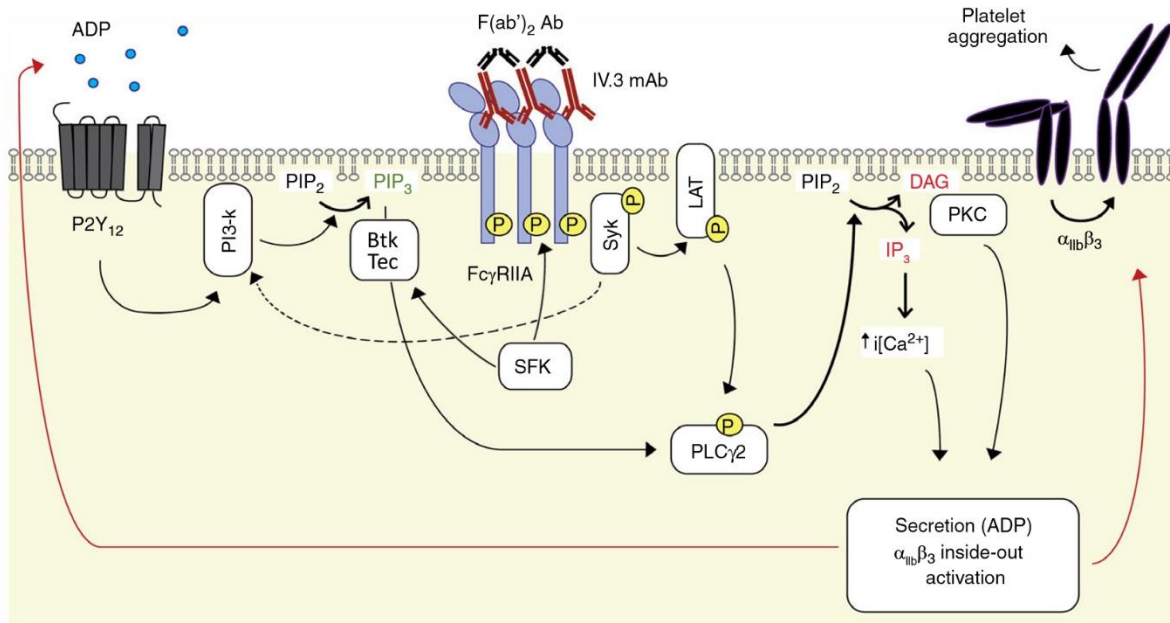


Abb. 3: Signalweg des FcγRIIA auf Thrombozyten. IV.3 mAb: monoklonaler anti-CD32 Antikörper. F(ab')₂ Ab: Sekundärer monoklonaler Antikörper. SFK: Src-Kinasen (z.B. Lyn). LAT: *linker of activated T-cells*. PLCγ2: Phospholipase Cy2. PIP₂: Phosphatidylinositolbisphosphat. PIP₃: Phosphatidylinositoltrisphosphat. Btk: Brutons Tyrosinkinase. Tec: *Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*. IP₃: Inositoltrisphosphat. DAG: 1,2-diacylglycerol. PKC: Proteinkinase C. PI3-K: Phosphoinositid-3-Kinasen. P2Y₁₂: ADP-Rezeptor. α_{IIb}β₃: GPIIb/IIIa, Fibrinogen-Rezeptor. (Modifizierte Abbildung aus Arman und Krauel 2015 reproduziert mit Erlaubnis des Herausgebers des *Journal of Thrombosis and Haemostasis*).

Obwohl eine vermehrte Phosphorylierung von Btk und Tec nach FcγRIIA Stimulation von Thrombozyten beschrieben wurde (Oda et al. 2000), ist unklar, welche Rolle diese Kinasen bei der FcγRIIA-induzierten PLCγ2 Stimulation und anschließenden Thrombozytenaktivierung spielen. Thrombozyten verfügen über einen weiteren ITAM-Rezeptor, das Glykoprotein VI (GPVI). Dieser Rezeptor wird durch die Bindung von Kollagen aktiviert und löst einen ähnlichen Signalweg aus wie FcγRIIA (Moroi und Watson 2015). Bei der Kollagen-induzierten GPVI-Aktivierung sind sowohl Tec als auch Btk an der Aktivierung der PLCγ2 und der anschließenden Thrombozytenaktivierung über Erhöhung von IP₃, DAG, Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ Levels, und der Aktivierung der Proteinkinase C beteiligt (Atkinson et al. 2003; Moroi und Watson 2015).

Ein weiterer Agonist des FcγRIIA ist der CD9-Antikörper, ein IgG1. Die Thrombozytenaktivierung findet hier nicht über das CD9-Antigen (ein Tetraspanin) selbst statt. Der Fab-Teil des Antikörpers bindet an CD9 und der Fc-Teil interagiert

mit dem FcγRIIA Rezeptor und führt so zur Thrombozytenaktivierung (Worthington et al. 1990; Berlacher et al. 2013). Der Signalweg für die Thrombozytenaktivierung läuft hier etwas anders ab als beim *cross-linking*, so assoziieren die Tyrosinkinasen p72/Syk und p53/56/Lyn beispielsweise kaum mit dem FcγRIIA Rezeptor (Qi et al. 1996).

Btk spielt auch eine Rolle bei der Aktivierung des GPIb durch vWF. GPIb-Stimulation führt ähnlich wie die GPVI- und FcγRIIA-Stimulation über die Aktivierung von Syk und LAT zur Bildung von PIP₃ und zur Btk-Aktivierung. Dies wurde *in vitro* in Bocotrecin-stimulierten Mausthrombozyten gefunden (Liu et al. 2006). Bocotrecin (für Mausthrombozyten) und Ristocetin (für humane Thrombozyten) sind Antibiotika, welche unter statischen Bedingungen *in vitro* die Bindung des globulären vWF an GPIb auf der Thrombozytenoberfläche und dessen Aktivierung ermöglichen. Dies führt zunächst zu einer Thrombozyten-Agglutination und anschließend, vermittelt durch GPIb *signaling*, zur einer GPIIb/IIIa-abhängigen Thrombozytenaggregation (Liu et al. 2004; Garcia et al. 2005; Jenkins et al. 1976; Liu et al. 2006).

1.3.4 Spontanaggregation

Bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Diabetes, seltener aber auch bei gesunden Probanden, wurde bei der Untersuchung von plättchenreichem Plasma (PRP) eine erhöhte Spontanaggregation (SPA) gefunden, also eine Aggregation, die ohne Zugabe eines Thrombozyten-Agonisten beobachtet werden kann (Mazurov et al. 2013; Gabbianelli et al. 2003; Hara et al. 2012). Einige Studien zeigen, dass eine erhöhte SPA gemessen im PRP als Risikomarker für arterielle Verschlusskrankheiten dienen könnte (Trip et al. 1990; Breddin 1999).

Es ist jedoch zweifelhaft, ob die SPA gemessen im gerührten Blut mit MEA einen klinisch sinnvollen Parameter darstellt. So wurde gefunden, dass die SPA im MEA auf die Freisetzung von ADP aus hämolysierten Erythrozyten im Blut zurückzuführen ist, welches während der – laut Anleitung vom Hersteller des MEA-Messgerätes – dreiminütigen Vorinkubationszeit und Erwärmungsphase gerührt wird (Bampalis 2012). Dadurch werden auch die Messwerte der anschließend induzierten Aggregation verfälscht, die dann signifikant höher ausfallen. Um die SPA so niedrig wie möglich zu halten, wurde daher empfohlen, das Blut während der Vorinkubation nicht zu rühren (Bampalis et al. 2012).

1.4 Btk-Inhibitoren

1.4.1 Brutons Tyrosin Kinase

Die Brutons Tyrosin Kinase (Btk) ist eine nicht Rezeptor-assoziierte zytoplasmatische Tyrosin-Kinase der Tec-Familie (Kazianka et al. 2017; Barf et al. 2017). Sie spielt eine zentrale Rolle im Signalweg des B-Zellrezeptors von B-Lymphozyten. Hier reguliert das Enzym die Proliferation der Zellen und ist daher ein pharmakologisches *target* bei der Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie (CCL) (Bottoni et al. 2016). Btk wird in Prä-B-Zellen, B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie in Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. In T-Lymphozyten und Plasmazellen tritt sie dagegen nicht auf (Futatani et al. 2001; Bobe et al. 2001; Quek et al. 1998; Ren et al. 2016; Dispenza et al. 2017). Btk ist benannt nach Colonel Ogden Bruton, der sie 1952 im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild XLA zum ersten Mal beschrieb (Bruton 1952). Bei XLA (*hereditary X-linked agammaglobulinemia*, auch Bruton-Syndrom) liegt ein genetisches Defizit oder eine Dysfunktion der Btk vor. Da Btk unter anderem an der Entwicklung von B-Lymphozyten beteiligt ist, kommt es bei XLA zu einem B-Lymphozyten-Defizit mit daraus folgender verminderten Antikörper-Produktion (Hypo- oder Agammaglobulinämie) und wiederkehrenden bakteriellen Infektionen (Ochs und Smith 1996).

Die Stimulation von GPVI durch *collagen-related peptide* (CRP) beziehungsweise Kollagen mit nachfolgender PLC γ 2-Phosphorylierung und Thrombozytenaktivierung ist bei XLA-Patienten deutlich reduziert, wodurch es zu keiner oder nur geringer Thrombozytenaggregation kommt (Quek et al. 1998; Busygina et al. 2019). Durch höhere Dosen Kollagen und CRP kann dieser funktionelle Defekt überwunden werden, und zwar durch Aktivierung der strukturell homologen Tyrosinkinase Tec (Atkinson et al. 2003).

Btk enthält eine Pleckstrinhomologe (PH), eine Techomologe (TH), und drei Src-homologe Domänen (SH3, SH2 und SH1). Die SH1 Domäne stellt die Kinase-Domäne dar (Futatani et al. 2001; Mohamed et al. 2009) (**Abb. 4**). Nach einer PI3-Kinase Aktivierung kommt es zu einem erhöhten Membranlevel von PIP $_3$, welches an die hoch-affine PH-Domäne der Btk bindet und zur deren Translokation zur Plasmamembran führt. Dort phosphoryliert die Src-homologe Kinase Lyn Y-551 in der SH1-Domäne, was zur Autophosphorylierung von Y-233 in der SH3 Domäne führt (Busygina et al. 2019; Mohamed et al. 2009).

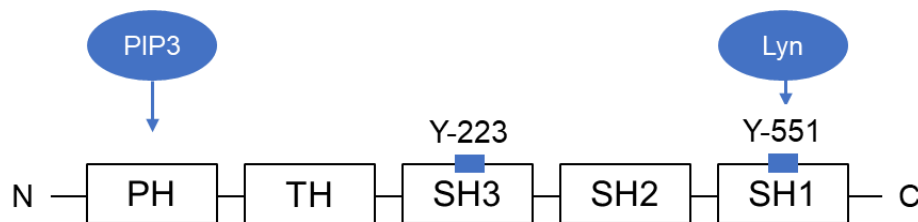


Abb. 4: Struktur der Btk. PH: Pleckstrin Homologie, TH: Tec-Homologie, SH1: Src-Homologie 1, SH2: Src-Homologie 2, SH3: Src-Homologie 3, PIP₃: Phosphatidylinositoltrisphosphat, Lyn: Tyrosinkinase der SRC-Familie

1.4.2 Irreversible Btk-Inhibitoren

Btk verfügt über ein Cystein in der ATP-Bindungsstelle (Cys481). Nur insgesamt 10 weitere Kinasen im menschlichen Genom besitzen ein Cystein an entsprechender Stelle. Diese sind drei Kinasen der EGFR-Familie (EGFR, ErbB2 und ErbB4), fünf der Tec-Familie (Btk, Bmx, Itk, Tec und Txk), eine der Src Familie (Blk) und Jak3. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden selektive Btk-Inhibitoren entwickelt, welche möglichst gezielt kovalent an dieses Cystein in Btk binden und somit irreversibel dessen Enzymaktivität hemmen (Honigberg et al. 2010; Pan et al. 2007; Walter et al. 2016; Yasuhiro et al. 2017). Einer der ersten und bisher am besten erforschte dieser Btk-Inhibitoren ist Ibrutinib (PCI-32765) (Honigberg et al. 2010).

Die Btk-Inhibitoren wurden bisher unter anderem dazu eingesetzt, die Proliferation von B-Zellen bei chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) zu hemmen (Burger et al. 2015). Inzwischen haben viele Studien gezeigt, dass Btk-Inhibitoren auch die GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Kollagen hemmen (Rigg et al. 2016; Chen et al. 2018; Levade et al. 2014; Kamel et al. 2015). Die Thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung wird allerdings nur marginal durch die Btk-Inhibitoren beeinflusst, auch bei Stimulation mit ADP oder AA haben die Btk-Inhibitoren keinen oder nur geringen Effekt (Busygina et al. 2018; Bye et al. 2015; Bye und Gibbins 2018).

In Thrombozyten von Btk-defizienten *XID*-(*X-linked immunodeficiency*)-Mäusen kommt es nicht zur Thrombozytenaggregation durch vWF (Liu et al. 2006). In Übereinstimmung damit wird in humanen Thrombozyten die Ristocetin-induzierte

Thrombozytenaggregation *in vitro* und *ex vivo* durch Ibrutinib gehemmt (Busygina et al. 2018; Denzinger et al. 2019).

1.4.2.1 Ibrutinib (PCI-32765)

Ibrutinib ist einer der ersten, oral verabreichten irreversiblen Btk-Inhibitoren, der zur Behandlung der CLL sowie des Mantelzelllymphoms (MCL) und Morbus Waldenström eingesetzt wurde (Honigberg et al. 2010; Byrd et al. 2013; Wang et al. 2015; Lipsky et al. 2015).

Die Verträglichkeit von Ibrutinib ist relativ gut (IMBRUVICA 2018). Studien belegen meist gastrointestinale Nebenwirkungen mit einem Schweregrad von 1 oder 2. Hämatologische Nebenwirkungen von Grad 3 und 4 sind selten, treten aber unter anderem in der Form von Neutropenie (12,5%), Thrombozytopenie (7,2%) und Anämie (7,1%) auf (Tucker und Rule 2015). Bei 39% der Patienten kommt es zu meist leichten Blutungen in Form von Hämatomen oder Petechien, bei längerer Therapie treten diese bei bis zu 61% der Patienten auf. Ernstere Blutungen von Grad 3 oder höher sind nur bei 3% der Patienten feststellbar (Kazianka et al. 2017; IMBRUVICA 2018; Brown et al. 2019).

Ibrutinib ist allerdings kein selektiver Btk-Inhibitor, es wirkt in hohen Konzentrationen auch hemmend auf Kinasen der Src-Familie (Lyn und Fyn), außerdem auf EGFR, Tec, Itk und Txk, für die Ibrutinib jedoch eine deutlich niedrige Affinität hat als für Btk. Manche dieser *off-target* Wirkungen könnten der Grund sein, warum im Rahmen der Therapie mit Ibrutinib Hämostasestörungen mit erhöhter Blutungsneigung festgestellt wurden. Die Src-Kinasen sind nicht nur bei der Phosphorylierung des ITAM des GPVI-Signalwegs beteiligt, sondern spielen auch eine zentrale Rolle beim Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ *signaling* und damit der Thrombozytenaggregation. Tec hat beim GPVI-Signalweg eine wichtige Funktion und wird als *off-target* Effekt gehemmt, sodass bei gleichzeitiger Btk-Hemmung GPVI kaum noch aktivierbar ist (Byrd et al. 2015a; Bye et al. 2015; Busygina et al. 2019; Atkinson et al. 2003; Bye et al. 2017). Da bei XLA-Patienten Tec die Rolle von Btk übernimmt und somit keine Blutungen auftreten (Busygina et al. 2019), sollte eine niedrigere Dosis Ibrutinib, die ausschließlich Btk hemmt, keine Blutungen hervorrufen.

Aufgrund der relativ geringen Btk-Selektivität von Ibrutinib wurden weitere, selektivere Btk-Inhibitoren entwickelt.

1.4.2.2 Neuere Btk-Inhibitoren

Acalabrutinib (ACP-196), ONO/GS-4059 (Tirabrutinib) und BGB-311 (Zanubrutinib) gehören zu den irreversiblen Btk-Inhibitoren der zweiten Generation, die in *in vitro* Kinase Tests Btk wesentlich selektiver hemmen als Ibrutinib. Sie binden ebenfalls kovalent an Cystein 481 (Wu et al. 2016b; Byrd et al. 2015b; Tam et al. 2015; Walter et al. 2016). Acalabrutinib wurde im November 2017 vom FDA ebenfalls zur Behandlung des Mantelzelllymphoms zugelassen (Markham und Dhillon 2018; CALQUENCE 2017). Acalabrutinib ist zwar spezifischer für Btk als Ibrutinib, dafür hemmt Ibrutinib Btk in etwa 10-fach niedrigeren Konzentrationen verglichen mit Acalabrutinib. Bei hohen Konzentrationen hemmen jedoch beide auch Tec. ONO/GS-4059 besitzt *in vitro* dagegen eine ähnliche Affinität für Btk und Tec.

Es wurde gefunden, dass ebenso wie Ibrutinib auch die neueren Btk-Inhibitoren die GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung *in vitro* (Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) und auch *ex vivo* (Acalabrutinib) hemmen (Bye et al. 2017; Denzinger et al. 2019). Auch die vWF/GPIIb-abhängige Thrombozytenaggregation nach Ristocetin-Stimulation war um >80% gehemmt, ohne große Unterschiede zwischen den einzelnen Inhibitoren. Die durch TRAP, ADP oder AA ausgelöste Aggregation wurde dagegen nicht gehemmt, da die Fibrinogen-vermittelte Aggregation nicht von Btk-Inhibitoren beeinflusst wird (Kamel et al. 2015; Bye et al. 2017; Busygina et al. 2019).

Die Nebenwirkungen von Acalabrutinib und ONO/GS-4059 sind vergleichbar mit denen von Ibrutinib. Bei der Behandlung von CLL oder MCL konnten keine Unterschiede der Häufigkeit von niedrig-gradigen Blutungen zwischen Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 festgestellt werden (Busygina et al. 2019). BGB-3111 verfügt über eine gute orale Bioverfügbarkeit und ist ebenfalls gut verträglich. Bei einer Dosis von 320 mg/Tag hat es eine achtmal höhere Plasma-Protein-Bindung als Ibrutinib (560 mg/Tag), wodurch es zu einer längeren Halbwertszeit und konstanteren Btk-Hemmung kommt. Es hat eine geringe Toxizität, hochgradige Blutungen sind nicht bekannt (Tam et al. 2019; Zhu et al. 2017; Wu et al. 2016a).

Der noch sehr neue irreversible Btk-Inhibitor Evobrutinib ist sehr selektiv für Btk und hemmt primär B-Zell-Reaktionen, unter anderem deren Proliferation und die Freisetzung von Antikörpern und Zytokinen. Er zeigte kürzlich vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung von Patienten mit Multipler Sklerose, wo er bei einer täglichen Dosis von 75 mg das Voranschreiten der Nervenläsionen eindämmte

(Montalban et al. 2019). Er soll in Zukunft auch auf seine Wirksamkeit in der Behandlung von rheumatoider Arthritis (RA) und systemischem Lupus erythematoses (SLE) hin untersucht werden (Amsel 2019).

Diese neuen Btk-Inhibitoren weisen zwar eine größere Selektivität, allerdings auch eine geringere inhibitorische Potenz als Ibrutinib auf (Yasuhiro et al. 2017).

1.4.3 Reversible Btk-Inhibitoren

Aufgrund der Toxizität infolge von *off-target* Effekten der irreversiblen Btk-Inhibitoren, sind sie bisher nicht zur Behandlung von SLE, RA oder anderen Autoimmunerkrankungen zugelassen (Liang et al. 2018). Daher werden zurzeit reversible Inhibitoren mit sehr hoher Selektivität für Btk entwickelt, welche nicht wie die irreversiblen Btk-Inhibitoren an Cys481 binden.

Reversible Btk-Inhibitoren werden vor allem im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen erforscht, da sie Btk auch in Monozyten und Makrophagen hemmen und somit unter anderem die FcγR-vermittelte TNFα-Produktion unterdrücken (Herman et al. 2018; Katewa et al. 2017).

Einer dieser reversiblen Btk-Inhibitoren ist GDC-0853 (Fenebrutinib). Es hemmt Btk durch Bindung an eine spezifische Stelle in der SH3 Domäne. Die Bindung erfolgt nicht kovalent, sondern über Wasserstoff-Brückenbildung und Van der Waals Kräfte (Liang et al. 2018). Bisher gilt GDC-0853 als der selektivste Btk-Inhibitor. So zeigen *kinase-assays*, dass GDC-0853 die Btk-ähnliche Tyrosinkinase Tec nicht hemmt. Es weist eine geringere Toxizität auf als irreversible Btk-Inhibitoren und hat sehr gute pharmakokinetische Eigenschaften (Crawford et al. 2018). GDC-0853 ist oral bioverfügbar und gut verträglich, bei einer Dosis-Eskalationsstudie, in der gesunde Probanden 100-400 mg des Inhibitors pro Tag oral verabreicht bekamen, traten keinerlei Blutungen auf (Herman et al. 2018).

Ein weiterer sehr viel versprechender reversibler Inhibitor ist G-744. Er zeigt sehr gute Ergebnisse in einem Mausmodell der Lupus-Nephritis (Katewa et al. 2017).

PRN1008 ist ein weiterer reversibler, jedoch kovalenter, Btk-Inhibitor, der vor allem zur Behandlung von RA eingesetzt werden soll. Er wird aber auch auf seine Wirkung bei anderen Autoimmunerkrankungen hin untersucht, wie beispielsweise Immunthrombozytopenischer Purpura, Hauterkrankungen wie dem Pemphigus Vulgaris und anderen immunologischen Erkrankungen mit Beteiligung von Autoantikörpern und B-Zellen (Langrish et al. 2017). Er hat eine hohe Affinität für Btk, mit einer >90%igen

Bindung an Btk, welche langdauernd ist und nur langsam abnimmt (15% nach 24h), aufgrund kovalenter Bindungen, die jedoch nicht permanent sind. Er hat wenig *off-target* Wirkungen und ist deshalb sehr gut verträglich (Liang et al. 2018; Smith et al. 2017; Langrish et al. 2017).

2 Fragestellung

HIT ist die häufigste medikamenten-assoziierte Thrombozytopenie, die 0,2-3% der Patienten betrifft, die Heparin zur Therapie oder Prophylaxe erhalten. Sie kann zu lebensbedrohlichen venösen und/oder arteriellen Thrombosen bis hin zum Tod führen. HIT ist in seiner komplexen Pathogenese zwar bereits gut verstanden, allerdings noch nicht optimal therapierbar. Auslöser der Erkrankung ist die Bildung von IgG-Antikörpern gegen neue Epitope auf PF4, welche nach dessen Bindung an Heparin exponiert werden. Die gebildeten IgG-Heparin-PF4-Immunkomplexe können mit ihrem Fc-Teil an den thrombozytären Fc-Rezeptor (FcγRIIA) binden und diesen aktivieren. Dadurch kommt es zur Thrombozytenaggregation und -sekretion, und der Interaktion von Thrombozyten mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten, wodurch venöse und arterielle Thrombosen entstehen können.

Aus einer früheren Studie war bekannt, dass die Brutons Tyrosinkinase (Btk) nach FcγRIIA-Aktivierung in Thrombozyten stimuliert wird; die Bedeutung von Btk für die Thrombozytenaktivierung war jedoch unbekannt. Da die thrombozytäre FcγRIIA-Aktivierung eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von HIT spielt, aber bisher in der Therapie von HIT nicht berücksichtigt wird, wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die FcγRIIA-induzierte Thrombozytenaktivierung durch Btk-Inhibitoren gehemmt werden kann.

Es wurde daher der FcγRIIA auf Thrombozyten im Blut durch verschiedene Stimuli (CD32 *cross-linking*, CD9-Antikörper, HIT-Serum) aktiviert, und die Aggregation und Sekretion der Thrombozyten und deren Interaktion mit neutrophilen Granulozyten gemessen. Dabei wurde untersucht, ob diese durch die thrombozytäre FcγRIIA-Aktivierung ausgelösten Prozesse *in vitro* durch verschiedene, sich in klinischer Anwendung oder in klinischen Studien befindenden irreversiblen Btk Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) und einen reversiblen Btk-Inhibitor (GDC-0853) hemmbar waren. Außerdem wurde in einem *ex vivo* Versuch die Wirkung einer einmaligen oralen Einnahme von Ibrutinib auf die FcγRIIA-vermittelte Thrombozytenaggregation geprüft.

Das Ziel war es herauszufinden, ob Btk-Inhibitoren die Aktivierung des thrombozytären FcγRIIA reduzieren können und damit als eine neue zusätzliche Option bei der Behandlung von HIT in Frage kommen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Puffer

Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	B. Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Honeywell Research Chemicals, Seetze
PBS	Dulbecco's Phosphate buffered Saline, Taufkirchen

ATP-Sekretion

Luciferase	Chrono-Lume®, Chronolog, Havertown, Pennsylvania USA
ATP	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, Chronolog, Havertown, Pennsylvania USA

Antikörper

anti-CD32 (AT10)	<i>Monoclonal antibody</i> , ThermoFisher Scientific, Rockford, Illinois USA
anti-CD32 (IV.3)	<i>Monoclonal antibody</i> , GeneTex, Irvine, Kalifornien USA
Fab2	F(ab') ₂ -Goat anti-Mouse IgG (H+L) <i>cross-adsorbed secondary antibody</i> , ThermoFisher Scientific, Rockford, Illinois USA
anti-CD9	<i>Monoclonal antibody</i> (Ts9), ThermoFisher Scientific, Rockford, Illinois USA
anti-human IgG	ImmunoPure® Goat Anti-Human IgG (Fc) ThermoFisher Scientific, Rockford, Illinois USA
anti-CD14-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD66b	" <i>Pacific Blue</i> ", Biolegend, San Diego, Kalifornien USA
anti-CD41	PE <i>Mouse Anti-Human CD41a</i> Clone HIP8, BD Biosciences, Heidelberg

anti-CD62P	APC- <i>conjugated</i> , Biolegend, San Diego, Kalifornien USA
IgG1κP	PE- <i>conjugated isotype control</i> , Biolegend, San Diego, Kalifornien USA

Btk-Inhibitoren

Ibrutinib	PCI-32765, Selleckchem, München
Acalabrutinib	ACP-196, AdooQ BioScience, Irvine, Kalifornien USA
Tirabrutinib	ONO-4059, Selleckchem, München
Zanubrutinib	BGB-3111, MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, USA
Evobrutinib	M2951; MSC2364447C, MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, USA
Fenebrutinib	GDC-0853, MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, USA

Sonstiges

Kollagen	Horm, Nycomed Pharma, Unterschleissheim
ADP	<i>Adenosine 5'-diphosphate sodium salt</i> , Biopool, Wicklow, Irland
Ristocetin	RISTOtest Reagenz, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TRAP-6	PAR-1 Agonist, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Arachidonsäure	ASPItest, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Heparin	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, Ulm

Plaque	homogenisierte Gefäßplaques, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Richard Brandl aus dem Department Gefäßchirurgie des Krankenhauses Barmherzige Brüder München
HIT-Serum	Patientenserum mit nachgewiesenen HIT-spezifischen Antikörpern, zur Verfügung gestellt von OA Dr. med. Georg Wittmann aus der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutik und Hämostaseologie des Klinikums der Universität München in Großhadern
RBC lysis buffer	Fixationspuffer mit Formaldehyd (9,8%) 10X Stock verdünnt zu 1X Katalognummer: 422401 BioLegend San Diego, Kalifornien USA

3.2 Geräte

Multiplate®	Impedanzaggregometer, („ <i>multiple electrode aggregometry</i> “), Dynabyte Medical, München
Lumi-Aggregometer	„ <i>Platelet Ionized Calcium Aggregometer (PICA)</i> “, Chronolog, Havertown, Pennsylvania
FACS	BD FACSCanto („ <i>fluorescence-activated cell sorting</i> “), BD Biosciences, Heidelberg
Innovance® PFA-200	Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)

3.3 Sonstige Materialien

Safety-Multifly®-Kanüle	21-Gauge, Sarstedt, Nümbrecht
VACUETTE® Luer-Adapter	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Multiplate® Hirudin Blood Tube	Dynabyte Medical, München
LUMI-Aggregometer Küvetten	Chronolog, Havertown, Pennsylvania
Multiplate®-Küvetten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
S-Monovette®	3,8 ml 9NC/PFA, Sarstedt, Nürnberg
Kollagen/ADP-Kartuschen und	Siemens Healthcare, Erlangen
Kollagen/Epinephrin-Kartuschen	

3.4 Methoden

3.4.1 Blutabnahme

Die gesunden Probanden aus dem erweiterten Bekanntenkreis wurden über *WhatsApp*® am Tag der Blutabnahme kontaktiert. Die Spender gaben an, dass sie mindestens zwei Wochen vor der Blutabnahme keine Medikamente zu sich genommen hatten, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen könnten. Die Probanden stimmten nach einer ausführlichen Aufklärung der experimentellen Verwendung ihrer Blutproben zu und unterschrieben ein nach Beratung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München (AZ 365-14) erstelltes Informations- und Einwilligungsschreiben. Die Blutabnahme entsprach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen laut der Deklaration von Helsinki.

Die Blutabnahme erfolgte per Punktion einer Armvene mit Butterfly-Kanülen (21 Gauge), welche über Adapter mit Hirudin-Vakuum-Monovetten (3 ml) verbunden wurden. Die finale Hirudinkonzentration im Blut betrug 200 U/ml bzw. ca. 15 µg/ml. Alternativ wurde das Blut mit Küvetten abgenommen, die 0,38 ml gepuffertes Natriumcitrat (0,129 mol/l) enthielten. Je nach Versuch wurden zwischen 10 und 20 ml Blut abgenommen.

3.4.2 Multiplate® (Messung der Thrombozytenaggregation im Blut)

Die Thrombozytenaggregation im Blut wurde mithilfe des Multiplate® gemessen, eines weiterentwickelten Impedanzaggregometers der Firma Dynabyte (Vertrieb jetzt über Verum Diagnostica, Roche). Das Gerät verfügt über fünf Kanäle, an denen gleichzeitig gemessen werden kann. Die Metallplatte, die die Kanäle enthält, hat eine

Temperatur von 37°C und erwärmt somit das Blut. In jeden Kanal kann eine Einwegküvette eingesetzt werden, die zwei Impedanz-Sensoren (zwei Platin-Elektrodenpaare) enthält. Pro Testzelle sind also insgesamt vier Elektroden (zwei Anoden, zwei Kathoden) an der Messung beteiligt, weshalb das Verfahren auch als „multiple electrode aggregometry“ (MEA) bezeichnet wird (**Abb.5**). Durch Anlagerung aktivierter und aggregierter Thrombozyten an die Elektroden kommt es zu einem verminderten Stromfluss zwischen Kathode und Anode und dadurch zu einem erhöhten elektrischen Widerstand (bei Wechselstrom Impedanz genannt). Die Impedanzänderung ist proportional zur Thrombozytenaggregation und wird von den beiden Sensoren über die gesamte Messzeit unabhängig voneinander aufgezeichnet. So entstehen zwei Aggregationskurven, die im Idealfall kaum voneinander abweichen. Andernfalls wird die Messung verworfen. Der Mittelwert beider Kurven wird in Aggregationseinheiten (AU, Aggregation Units) angegeben, die Fläche unter der Kurve über die gemessene Zeit in AU*min. Während der gesamten Messung wird das Blut kontinuierlich mit einem PTFE-(*Poly-tetra-fluoro-ethylene*)-beschichteten magnetischen Rührer gerührt (900 U/min) (Tóth et al. 2006; Bampalis et al. 2012).

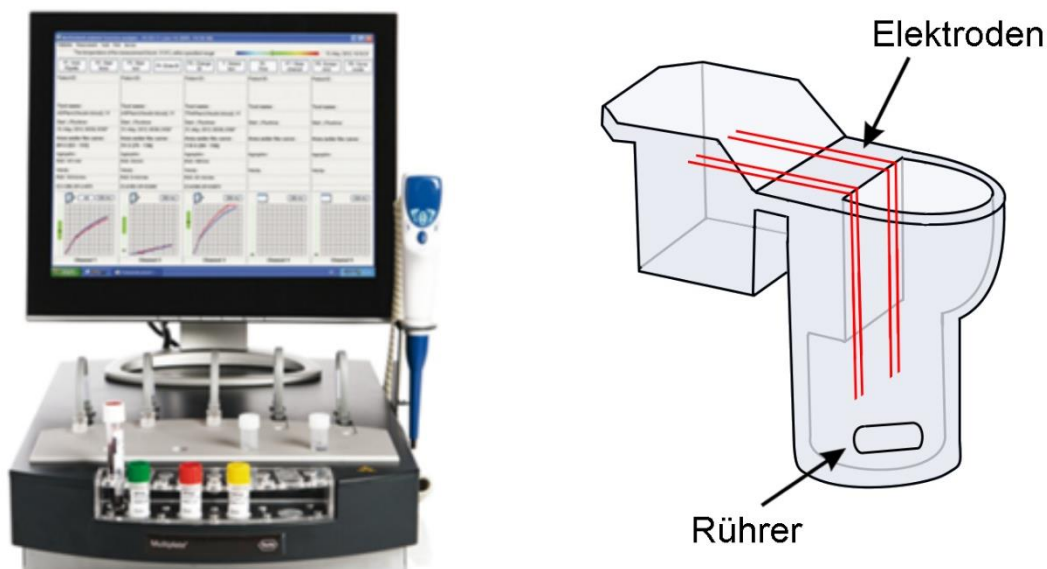


Abb. 5: Multiplate®-Gerät: Links: Einheit mit Kanälen und Bildschirm. Originalabbildung von Verum Diagnostica GmbH Roche, reproduziert mit Erlaubnis der Firma *Roche Diagnostics Deutschland GmbH*. **Rechts:** Schematische Darstellung einer Multiplate®-Küvette mit vier Elektroden und Rührer.

Jede Testzelle, aus der zunächst der Rührer entfernt wurde, um die durch ADP Freisetzung aus Erythrozyten bedingte Spontanaggregation zu verhindern, (Bampalis et al. 2012), wurde mit 300 µl NaCl gefüllt, anschließend wurden zuerst 0,6 µl eines Btk-Inhibitors oder DMSO (0,1% finale Konzentration) zur Lösungsmittel-Kontrolle und dann 300 µl Blut zugegeben und mit einer Pipette vermischt. Das Blut wurde für 5, 15, 30 oder 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei kurzen Inkubationszeiten (5 und 15 Minuten) wurden die Küvetten im Wärmeblock des Multiplate®-Gerätes inkubiert, bei längeren Zeiten (30 und 60 Minuten) dagegen abgedeckt in einem Inkubator. Danach wurden 1,2 µl des AT10-Antikörpers (2 µg/ml) zugegeben und für weitere 3 Minuten inkubiert, bevor 13,8 µl des Fab2-Antikörpers (30 µg/ml) zugegeben wurden. Gleichzeitig wurde der Rührer zugegeben und die Messung gestartet. Es wurde 10 Minuten lang gemessen. Bei den Messungen mit dem CD9-Antikörper war das Vorgehen dasselbe, nach der Inkubationszeit wurden 1,2 µl des Antikörpers (1 µg/ml) zugegeben und die Messung gestartet.

Für die Experimente mit HIT-Serum wurden auf HIT-spezifische IgG-Antikörper positiv im ELISA getestete Seren von 28 verschiedenen Patienten bereitgestellt (Dr. Georg Wittmann, Department für Transfusionsmedizin, Klinikum der LMU). 0,6 µl DMSO oder ein Btk-Inhibitor (Ibrutinib oder Acalabrutinib) wurden zu 200 µl NaCl in der Testzelle gegeben. Dann wurde 300 µl Blut zugegeben und mit einer Pipette gemischt, bevor es für 30 Minuten abgedeckt im Inkubator vorinkubiert wurde. Anschließend wurden 100 µl des HIT-Serums zugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Danach wurden 0,5 U/ml Heparin zugegeben und für 3 Minuten inkubiert, bevor die Messung mit Zugabe des Rührers gestartet wurde (Bampalis et al. 2012) und die Aggregation für 10 Minuten gemessen wurde. Kontrollwerte enthielten weder HIT-Serum noch Heparin, beziehungsweise nur Heparin.

3.4.3 Messung der ATP-Sekretion

Die ATP-Sekretion der Thrombozyten im Blut wurde mithilfe des LUMI-Aggregometer von Chronolog gemessen (Ingberman et al. 1979). Dieses Gerät misst die emittierte Lumineszenz, wenn ATP mit Luciferase interagiert. Es besteht aus zwei separaten Messeinheiten, die analog mit einem Schreiber verbunden sind, dessen Ausschlag die gemessene Lumineszenz wiedergibt.

Firefly-Luciferase ist ein Enzym, das die Oxidation des von biolumineszenten Organismen gebildeten Naturstoffs Luciferin in zwei Schritten katalysiert (Smirnova

und Ugarova 2017). Dabei reagiert im ersten Schritt das Luciferin mit ATP, woraufhin Luciferyl-Adenylat entsteht (LH₂-AMP). Dieses wird im zweiten Schritt in Anwesenheit von Luciferase und Sauerstoff oxidiert und bildet Oxyluciferin (Oxy-LH₂), CO₂ und AMP (**Abb 6**).

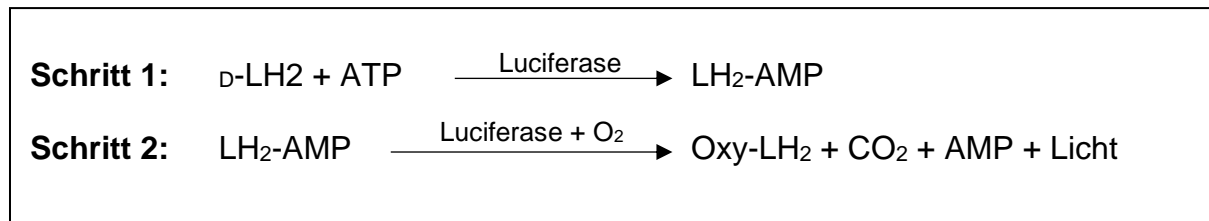


Abb. 6: Zweischnittige Reaktion der Luciferase. D-LH₂: Firefly Luciferin, ATP: Adenosin-5'-Triphosphat, LH₂-AMP: Luciferyl-Adenylat, Oxy-LH₂: Oxyluciferin, AMP: Adenosin-5'-Monophosphat

Oxyluciferin liegt normalerweise in einer von sechs möglichen Formen vor, in der Biolumineszenz-Reaktion tritt es in seiner elektronisch angeregten anionischen Keto-(1)-Form auf. Dieses Bioluminophor fällt in eine weniger energiereiche Form zurück und emittiert dabei Licht (Vieira et al. 2012). Über dieses emittierte Licht wird indirekt die ATP-Sekretion von aktivierten Thrombozyten gemessen.

Die ATP-Sekretionsmessungen wurden ähnlich wie die Aggregationsmessungen im Multiplate® durchgeführt (Bampalis 2012). Zur Erstellung einer ATP-Eichkurve wurde 200 µl Blut, antikoaguliert mit Hirudin, mit 200 µl NaCl in einer Chronolog-Küvette gemischt und für 3 min bei 37°C in dem LUMI-Aggregometer inkubiert. Anschließend wurde der Metall-Rührer zugegeben (Rührgeschwindigkeit 1100 rpm) und die Messung gestartet. Nach 2-3 Minuten wurde 30 µl Luciferin/Luciferase und anschließend ATP in steigenden Konzentrationen (50nM, 100nM, 200nM) zugegeben und der maximale Ausschlag des Schreibers für die jeweilige Menge aufgezeichnet. Zur Messung der Wirkung der Btk-Inhibitoren wurde der Hemmer (0,4 µl) bzw. DMSO (0,4 µl) zur Kontrolle zu 200 µl NaCl gegeben, bevor es mit 200 µl Hirudinblut gemischt wurde. Das Blut wurde dann bei 37°C für 30 Minuten in Messkammer des Geräts inkubiert. Bei Aktivierung durch CD32 *cross-linking* wurde danach 0,86 µl AT10 (2 µg/ml) zugegeben, gemischt und für 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Rührfisch zugegeben und die Messung gestartet. 30 µl Luciferin/Luciferase wurden zugegeben, und kurz danach 9,92 µl des Fab2-Antikörpers (30 µg/ml). Die Messungen wurden für etwa 2 Minuten durchgeführt, bis das Lumineszenzsignal maximal war, und begann, wieder abzunehmen.

Es wurde auch die Aktivierung mit dem CD9-Antikörper getestet, wobei das Blut mit 0,86 µl CD9-Antikörper (1 µg/ml) aktiviert wurde.

Die Maximale Lumineszenz des jeweiligen Runs wurde anschließend anhand der vorausgegangenen Eichung des Geräts mit ATP in sezernierte ATP Konzentrationen umgerechnet.

3.4.4 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit eine große Menge Zellen oder Zellpartikeln anhand ihrer optischen und fluoreszierenden Eigenschaften innerhalb kürzester Zeit zu analysieren. Das Gerät umfasst vier Hauptbestandteile: das Flüssigkeitssystem, das optische System, die Detektoren sowie einen Computer. Durch Überdruck wird die zu messende Probe über eine Stahlkapillare aufgenommen. Das Flüssigkeitssystem, bestehend aus einer meist in PBS gelösten Mantelflüssigkeit (*sheath fluid*), beschleunigt die aufgenommene Zellsuspension, woraufhin sich gebildete Aggregate auflösen und sich die einzelnen Partikel der Probe in einem schmalen Strahl anordnen, sodass sie jeweils einzeln den Analysepunkt erreichen. Dies wird als Hydrodynamische Fokussierung bezeichnet (Raffael 1988). Das optische System besteht aus einem Laser und verschiedenen Linsen, die den Laserstrahl formen und fokussieren. Der Laser wird so ausgerichtet, dass er jeweils nur die einzelnen zu messenden Partikel/Zellen in der Probe beleuchtet. Passiert einer dieser Partikel den Lichtstrahl, wird das Licht am Rand des Partikels entsprechend seiner Geometrie (rund oder diskoid) und intrazellulären Beschaffenheit gestreut (Adan et al. 2017). Enthält dieser Partikel fluoreszierende Bestandteile, wird außerdem ein Photonenimpuls bestimmter Wellenlänge emittiert (Ibrahim und van den Engh 2007). Sowohl die Streuung, als auch das emittierte Licht wird von Detektoren erfasst, die mit Filtern dem jeweiligen Messvorhaben angepasst werden können.

Bei der Lichtstreuung werden zwei Formen unterschieden, dem *Forward Scatter* (FSC) und dem *Side Scatter* (SSC). Das FSC entsteht durch die Ablenkung des Laserstrahls entlang seiner Achse und ist proportional zur Größe des Partikels oder der untersuchten Zelle. Das SSC entsteht durch frakturiertes oder abgelenktes Licht des Partikels und bildet einen Winkel von etwa 90° zum Laserstrahl. Es ist proportional zur Granularität und Komplexität der Zelle (**Abb. 7**). Die von den

Detektoren aufgenommen Signale werden in elektrische Datensätze umgewandelt und an den Computer weitergeleitet (Adan et al. 2017).

Beim FACS wird die Lichtstreuung gleichzeitig mit der Fluoreszenz der Proben gemessen. Unter Fluoreszenz versteht man das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Da Zellen nur wenige natürlich fluoreszierende Bestandteile enthalten, können sie durch Fluorophore eingefärbt werden. Jeder Fluorophor besitzt ein charakteristisches Emissionsspektrum und kann an spezifische Moleküle, z.B. Antikörper konjugiert werden, die an spezifische Rezeptoren auf Zellen oder an Proteine, welche nach Zellaktivierung exprimiert werden, binden. Auf diese Weise können unterschiedliche Zellpopulationen, und die Aktivierung von Zellen gemessen werden. Beispiele dieser Farbstoffe sind Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC), die für die Darstellung Immunfluoreszenz eingesetzt werden. In einer Probe können dabei unterschiedliche Fluorophore kombinieren werden. Die Fluoreszenz wird im gleichen Winkel emittiert wie das SSC (Wilkerson 2012; Adan et al. 2017; Raffael 1988) (**Abb. 7**).

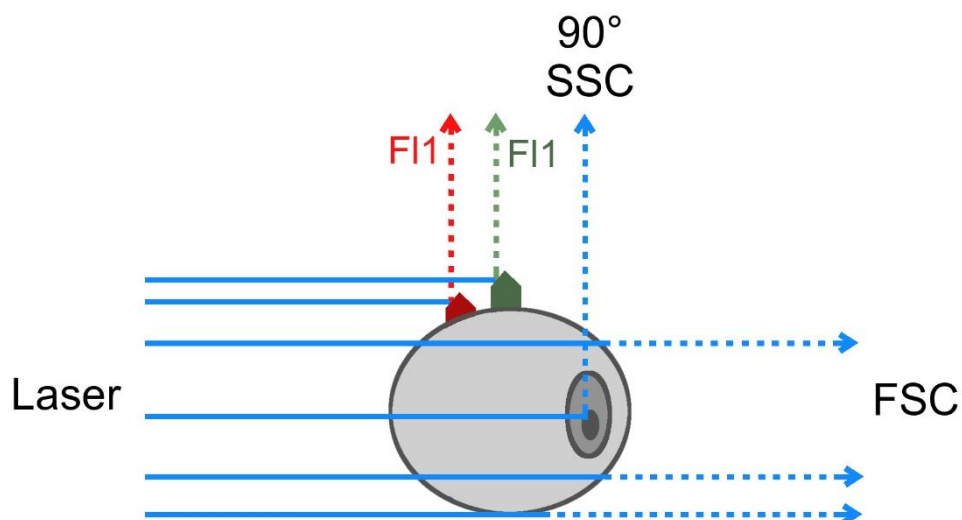


Abb. 7: Streuung und Emission des einfallenden Lichts beim FACS. FSC: *Forward Scatter*, SSC: *Side Scatter*, FI1/FI2: durch verschiedene Fluorophore emittiertes Licht.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten die gemessenen Daten anschließend sichtbar zu machen. Bei der Einzelparameter-Analyse wird ein Histogramm gebildet, bei dem die x-Achse die Ausprägung des gemessenen Parameters bestimmt und die y-Achse die Anzahl dieser Ereignisse. Bei der Zweiparameter-Analyse werden auf x- und y-Achse zwei unterschiedliche Parameter angegeben (z.B. FSC und SSC oder zwei unterschiedliche Marker), wodurch ein Streudiagramm entsteht, bei dem die Dichte

der aufgetragenen Punkte die Häufigkeit des Ereignisses darstellt (Adan et al. 2017). Durch das sogenannte „*Gating*“ können vom Nutzer Grenzwerte definiert werden, um Zellen mit bestimmten Eigenschaften zu isolieren (Ibrahim und van den Engh 2007).

In Eppendorf-Cups wurden zunächst 300 µl NaCl mit DMSO (0,1%) oder dem jeweiligen Btk-Inhibitor versetzt und danach mit 300 µl Blut gemischt. Die Proben wurden dann bei 37°C für 30 Minuten abgedeckt in einem Brutschrank inkubiert, bevor die Thrombozyten über CD32 *cross-linking* über eine Dauer von 10 Minuten aktiviert wurden (wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben). Die Aktivierung wurde ohne Rühren der Proben durchgeführt. Anschließend wurden von jeder Probe jeweils 100 µl in ein FACS Röhrchen pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert. Der Antikörper anti-CD41a-PE (5 µl) bindet an CD41-(Glykoprotein IIb)-auf Thrombozyten, anti-CD14-FITC (2 µl) an Monozyten und anti-CD66b-*Pacific blue* (2 µl) an neutrophile Granulozyten. Der APC-konjugierte anti-CD62P (2 µl) bindet an P-Selektin, einem Protein, das von aktivierten Thrombozyten sezerniert wird und somit einen Maßstab für die Thrombozytenaktivierung darstellt. Außerdem wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt mit passendem IgG1-PE-Antikörper (6 µl, gelöst im Verhältnis 1:100) als Negativkontrolle für die Thrombozytenbindung an neutrophile Granulozyten. Nach dieser Inkubation wurde zu jeder Probe 450 µl eines 1X RBC *lysis/fixation* Puffer zugegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert.

Die Messungen wurden durchgeführt mit dem FACS Canto II *flow cytometer* (BD Biosciences). Dabei wurden zunächst die *Gating*-Areale festgelegt. Bei der Isotypkontrolle wird das Ausmaß von nicht spezifischen Hintergrundsignalen in unstimuliertem Blut gemessen, die dadurch zustande kommen, dass Immunglobuline nicht spezifische Bindungen mit den Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche eingehen. Der IgG1kP-Antikörper entspricht hierbei der Konjugation und dem Isotyp des zu messenden primären Antikörpers, hier des Thrombozyten-spezifischen CD41-Antikörper. Wenn dieser Antikörper also an etwas anderes als an das spezifische Antigen binden wird das in den Messpunkten durch eine Verschiebung der Verteilungskurve sichtbar. Ist diese unspezifische Bindung zu hoch, würde das Experiment verfälscht, daher müssten andere Antikörperklone oder Antikörper von anderen Firmen getestet werden, bis keine unspezifischen Bindungen mehr auftreten.

Die FMO (*fluorescence minus one*) Kontrolle dient dazu die Gating-Grenzen zu definieren. Dabei wird eine Probe konjugiert mit dem Thrombozyten-affinen CD41-PE-Antikörper und eine ohne diese Färbung gemessen. Durch die Unterschiede in den Streudiagrammen beider Messungen lässt sich die Grenze des Gates manuell für die Thrombozyten festlegen. Diese Grenze wird dann für alle anschließenden Messungen übernommen (**Abb. 8**).

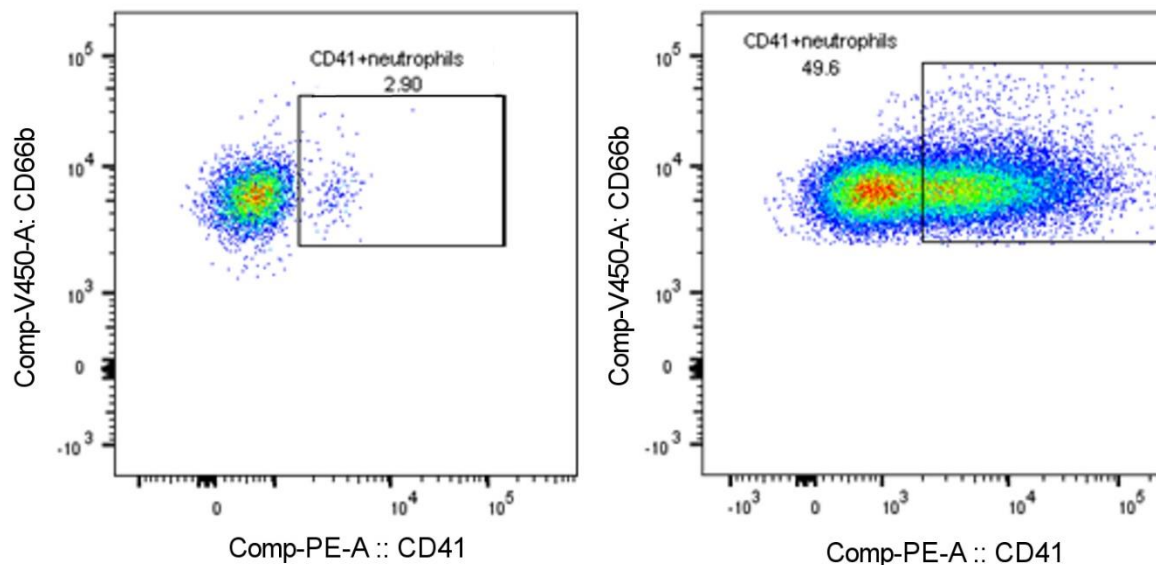


Abb. 8: Fluorescence minus one Kontrolle (FMO). Comp-PE-A: CD41: CD41-Antikörper konjugiert mit PE (Phycoerythrin), compV450-A: CD66b: CD66b-Antikörper konjugiert mit V450. Aktiviert wurde das Blut durch CD32 *cross-linking*. Die Zahlen 2,90 bzw. 49,6 bezeichnen den prozentualen Anteil an positiv gemessenen Zellen. **Links:** Färbung der Probe ohne CD41-PE-Antikörper. **Rechts:** Probe mit CD41-PE-Antikörper. Die Gating Grenze wird manuell anhand des sichtbaren Unterschieds festgelegt.

Die Thrombozyten-Neutrophil-Komplexe wurden anhand der Ereignisse, die nach CD32 *cross-linking* sowohl CD41 als auch CD66b positiv waren, bestimmt. Die Thrombozytenaktivierung wurde über das Auftreten erhöhter P-Selektin-APC-Fluoreszenz dargestellt. Die Ergebnisse der Messungen wurden anschließend in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben (**Abb. 9**).

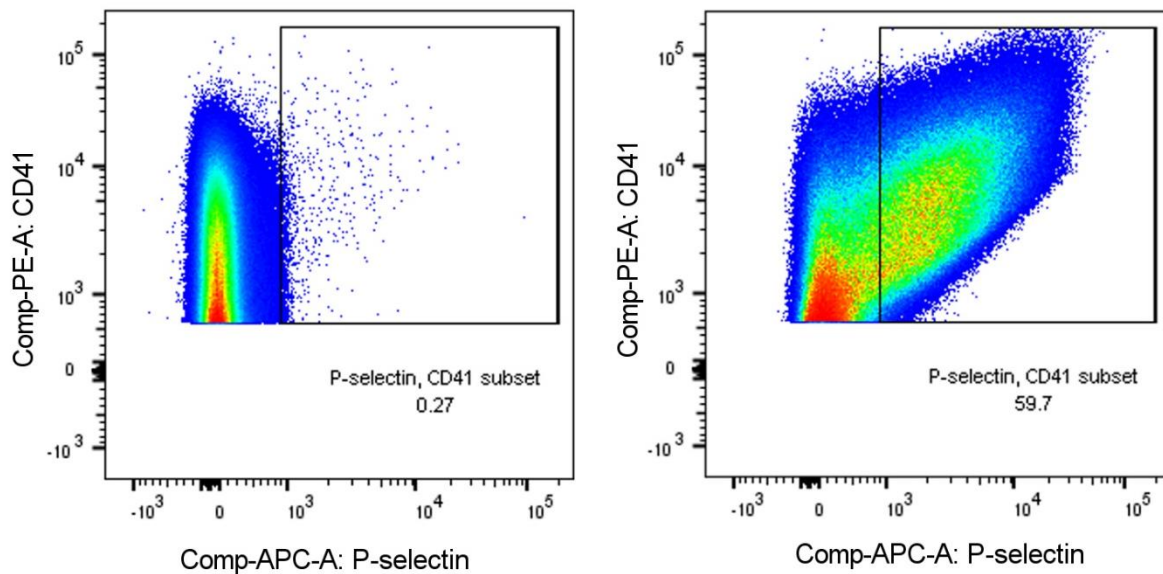


Abb. 9: Gating der Thrombozytenaktivierung im Streudiagramm. Comp-PE-A: CD41: CD41-Antikörper konjugiert mit PE (Phycoerythrin), Comp-APC-A: P-Selektin: anti-CD62P konjugiert mit APC. Die Zahlen 0,27 bzw. 59,7 bezeichnen den prozentualen Anteil an positiv gemessenen Zellen. **Links:** ohne Thrombozytenaktivierung, sichtbare anti-CD41-Fluoreszenz auf Thrombozyten, keine P-Selektin-Fluoreszenz. **Rechts:** nach Thrombozytenaktivierung durch CD32 *cross-linking*, sowohl anti-CD41-Fluoreszenz als auch P-Selektin-Fluoreszenz, was auf die P-Selektin-Sekretion aus aktivierten Thrombozyten hinweist.

3.4.5 Platelet function analyzer PFA-200® (Bestimmung der *in vitro* Verschlusszeit)

Der *platelet function analyzer-200* (PFA-200®) ist die Weiterentwicklung des PFA-100®. Beide Systeme benutzen ähnliche Prozesse, der PFA-200® besitzt allerdings eine verbesserte Software und eine überarbeitete Benutzeroberfläche als sein Vorgänger. Beide benutzen das gleiche Küvetten System, von dem es drei unterschiedliche Arten gibt. Von den zwei hier verwendeten Arten enthält das eine Kollagen (2 µg) und eine mit Epinephrin (10 µg) überzogene Membran (C/Epi), das andere Kollagen (2 µg) und eine mit Adenosindiphosphat (50 µg) überzogene Membran (C/ADP). 800 µl Blut wird in jeder Küvette in den Sensorbereich platziert und unter Vakuum angesaugt, wobei die Probe unter hohem Druck durch ein mikroskopisches Kapillarsystem die Membran passiert. Dies führt zur Thrombozytenaktivierung, Anlagerung und Aggregation, wodurch die Apertur verschlossen wird. Das Instrument misst die genaue Zeit, die für diesen Verschluss benötigt wird, und gibt sie als *closure time* (CT) wieder (Favaloro und Bonar 2018).

Im vorliegenden Versuch wurde Citrat-antikoaguliertes Blut verwendet, das in Fertigmonovetten (S-Monovette 9NC/PFA 3,8 ml) abgenommen wurde. Diese enthielten 0,38 ml gepuffertes Natriumcitrat (0,129 mol/l; pH 5,5). Verschiedene Konzentrationen von GDC-0853 (50nM, 100nM, 200nM, 500nM, 1000nM gelöst in DMSO), DMSO oder Kochsalzlösung (jeweils 0,8 µl) wurden zuerst in 50 µl NaCl pipettiert, anschließend wurden die Blutproben (750 µl) antikoaguliert mit Citrat (129mM) zugegeben. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert und dann wurde die in vitro Verschlusszeit mit dem Kollagen/Epinephrin-Filter des PFA-200® gemessen. Die Messungen wurden 75-150 Minuten nach der Blutabnahme durchgeführt.

3.4.6 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert angegeben \pm Standardabweichung (SD) aus n Experimenten mit unterschiedlichen Spendern. Die Daten wurden mit ANOVA für wiederholte Messungen analysiert. Für sekundäre Paarvergleiche wurde die *Least Significant Difference* ermittelt (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001) beziehungsweise eine Rangvarianzanalyse für verbundene Messungen mit dem Student-Newman-Keuls Test (+P < 0,05, ++P < 0,01, +++P < 0,001).

4 Ergebnisse

4.1 Fc-Rezeptor vermittelte Thrombozytenaktivierung durch CD32 *cross-linking* und CD9-Antikörper

Der thrombozytäre Fc-Rezeptor Fc γ RIIA (CD32a) wurde durch Inkubation mit dem primären monoklonalen CD32 Antikörper-Klon AT10 und dessen *cross-linking* mit dem sekundären, gegen IgG der Maus gerichteten Fab2-Antikörper aktiviert. In Hirudin-antikoagulierte Blut führte dies zur Thrombozytenaggregation, die mittels MEA gemessen wurde, und zur ATP-Sekretion, welche mit dem LUMI-Aggregometer gemessen wurde (**Abb. 10**).

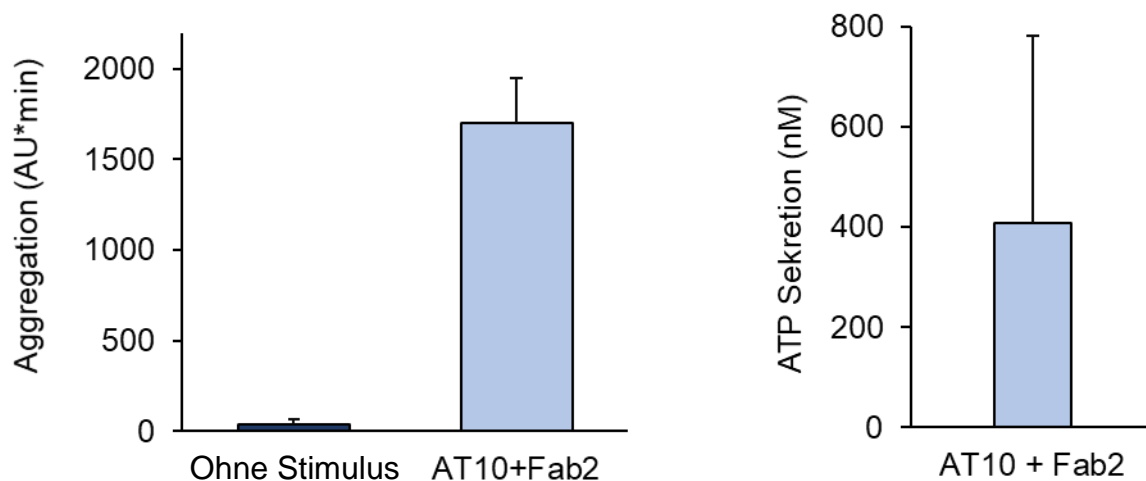


Abb. 10: Thrombozyten Fc-Rezeptor-Aktivierung durch CD32 *cross-linking*. Die Blutproben wurden für 60 Minuten mit DMSO (0,1%) inkubiert und dann für 3 Minuten mit AT10 (2 μ g/ml), anschließend wurde unter Rühren der Proben mit Fab2 (30 μ g/ml) stimuliert und für 10 Minuten gemessen. **Links:** Das CD32 *cross-linking* stimulierte die Thrombozytenaggregation im Vergleich zur Probe ohne Stimulus (die Werte sind Mittelwerte \pm SD, n=12). **Rechts:** Stimulation der ATP-Sekretion (die Werte sind Mittelwerte \pm SD, n=5).

Außerdem wurden die Thrombozyten mit einem monoklonalen Antikörper (Ts9) gegen CD9 (Tetraspanin) aktiviert. Dieser bindet hierbei nicht nur an das CD9-Antigen auf der Thrombozytenoberfläche, sondern mit seinem Fc-Teil auch an den Fc γ RIIA, und aktiviert die Thrombozyten über den gleichen Signalweg wie CD32 *cross-linking* (Worthington et al. 1990; Berlacher et al. 2013). Durch eine Blockierung des Fc γ RIIA mit AT10 war die Thrombozytenaggregation hemmbar, was bestätigt, dass die durch CD9-Antikörper vermittelte Thrombozytenaggregation von diesem Rezeptor abhängig ist (**Abb 11A**). Verschiedene Konzentrationen des CD9-Antikörpers (0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml und 2 μ g/ml) wurden getestet, lösten aber alle eine

vergleichbare Aggregation aus, welche nur etwa 75% der Aggregation durch CD32 *cross-linking* entsprach. Die niedrigere Aggregation ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der CD9-Antikörper im Gegensatz zum CD32 *cross-linking* keine ATP-Sekretion aus den Thrombozyten auslöste (**Abb 11B**). Dies weist auf grundlegende Unterschiede der Aktivierung des Fc-Rezeptors durch CD32 *cross-linking* und CD9-Antikörper hin. Es wurden daher im Folgenden beide Stimuli des FcγRIIA verwendet.

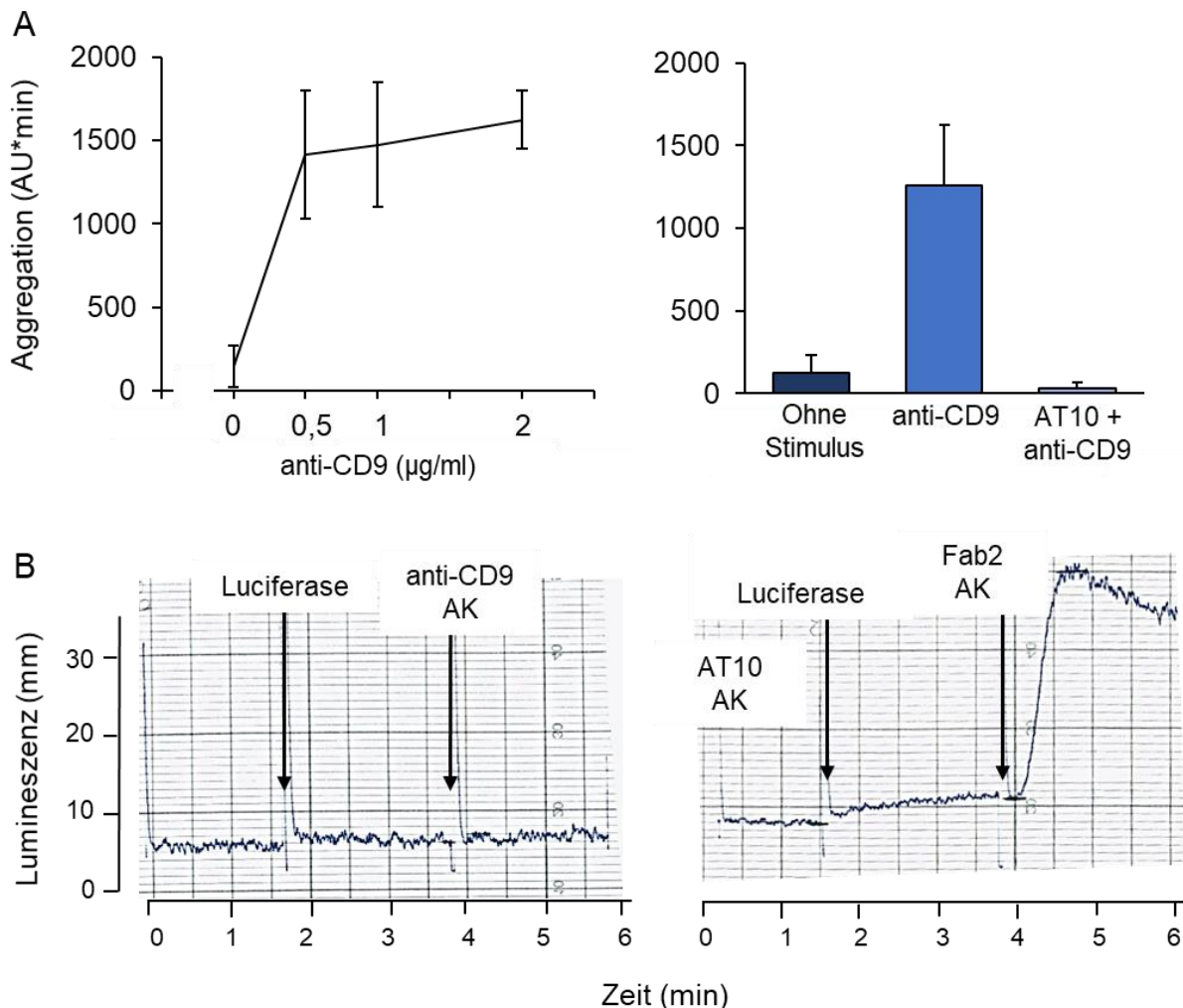


Abb. 11: Thrombozyten Fc-Rezeptoraktivierung durch CD9-Antikörper (anti-CD9). Die Blutproben wurden für 60 Minuten mit DMSO (0,1%) inkubiert, anschließend wurde mit dem CD9-Antikörper (1μg/ml) unter Rühren stimuliert und für 10 Minuten gemessen. **(A)** Wirkung steigender Konzentrationen des CD9-Antikörpers auf die Thrombozytenaggregation (**links**, die Werte sind Mittelwerte \pm SD, $n=5$). Hemmung der Thrombozytenaggregation durch 3-minütige Vorinkubation mit dem CD32 Antikörper AT10 (2μg/ml) (**rechts**, die Werte sind Mittelwerte \pm SD, $n=4$). **(B)** Thrombozyten-Stimulation mit CD9-Antikörper (1μg/ml) stimuliert keine ATP-Sekretion (**links**) im Gegensatz zum CD32 *cross-linking* (**rechts**). Die ATP-Sekretions-Kurven (gemessen mit dem LUMI-Aggregometer) sind repräsentativ für mehrere Experimente mit zwei verschiedenen Blutspendern.

4.2 Hemmung der Fc-Rezeptor vermittelten Thrombozytenaggregation im Blut durch die irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059 (Tirabrutinib), BGB-3111 (Zanubrutinib) und Evobrutinib und durch den reversiblen Btk-Inhibitor GDC-0853 (Fenebrutinib)

Nach 60-minütiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Btk-Inhibitoren beziehungsweise mit DMSO (0,1%) zur Kontrolle, wurde der Fc-Rezeptor über CD32 *cross-linking* und mit dem CD9-Antikörper stimuliert.

Die Hemmung der durch CD32 *cross-linking* induzierte Thrombozytenaggregation war deutlich, und betrug für Ibrutinib (0,2µM), Acalabrutinib (1µM), ONO/GS-4059 (1µM), BGB-3111 (0,4µM) und Evobrutinib (2,5µM) jeweils >98%, 90%, 94%, 95% und 94% (**Abb. 12**). Die IC₅₀-Werte (= Inhibitor-Konzentration, bei der die Hälfte der maximal möglichen Hemmung erreicht wird), waren für Ibrutinib 0,08µM, Acalabrutinib 0,38µM, ONO/GS4059 0,42µM, BGB-3111 0,11µM und für Evobrutinib 1,13µM (**Tabelle 1**).

Btk-Inhibitor	CD32 <i>cross-linking</i> IC ₅₀ (µM)	CD9-Antikörper IC ₅₀ (µM)
Ibrutinib	0,08±0,04	0,05±0,01
Acalabrutinib	0,38±0,16	0,26±0,08
ONO/GS-4059	0,42±0,16	0,26±0,06
BGB-3111	0,11±0,03	0,09±0,02
Evobrutinib	1,13±0,48	0,92±0,15
GDC-0853	0,011±0,0039	-----

Tabelle 1: IC₅₀ der Btk-Inhibitoren für die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch CD32 *cross-linking* und CD9-Antikörper. Steigende Konzentrationen der Btk-Inhibitoren wurden mit Blut für 60 Minuten beziehungsweise 15 Minuten (GDC-0853) bei 37°C inkubiert, anschließend wurde der Fc-Rezeptor der Thrombozyten durch CD32 *cross-linking* oder CD9-Antikörper für 10 Minuten aktiviert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=6 für CD32 *cross-linking*, n=5 für CD9-Antikörper Stimulation).

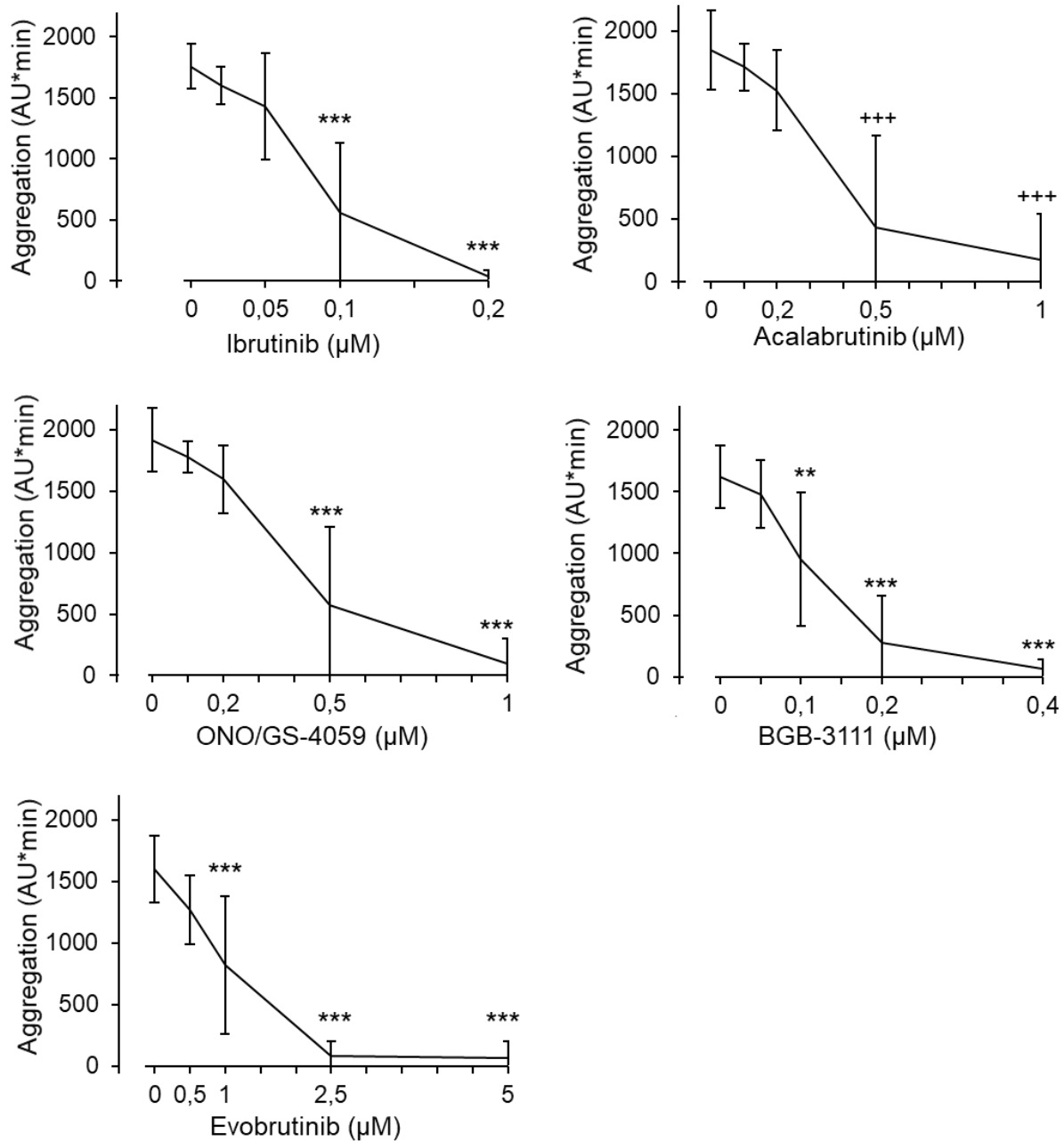


Abb. 12: Wirkung verschiedener Konzentrationen irreversibler Btk-Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation im Blut nach FcγRIIA-Stimulation durch *cross-linking*. Die Blutproben wurden für 60 Minuten mit DMSO (0,1%) beziehungsweise mit unterschiedlichen Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) inkubiert. Anschließend wurde der anti-CD32-Antikörper AT10 zugegeben (2μg/ml) und für weitere drei Minuten inkubiert, bevor der Fab2 anti-mouse IgG zugegeben wurde (30μg/ml) und die Messung gestartet wurde. Die Messung dauerte 10 Minuten. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, +P < 0,05, ++P < 0,01, +++P < 0,001.

Die durch den CD9-Antikörper induzierte Thrombozytenaggregation wurde ebenfalls dosisabhängig durch die Btk-Inhibitoren gehemmt (**Abb. 13**).

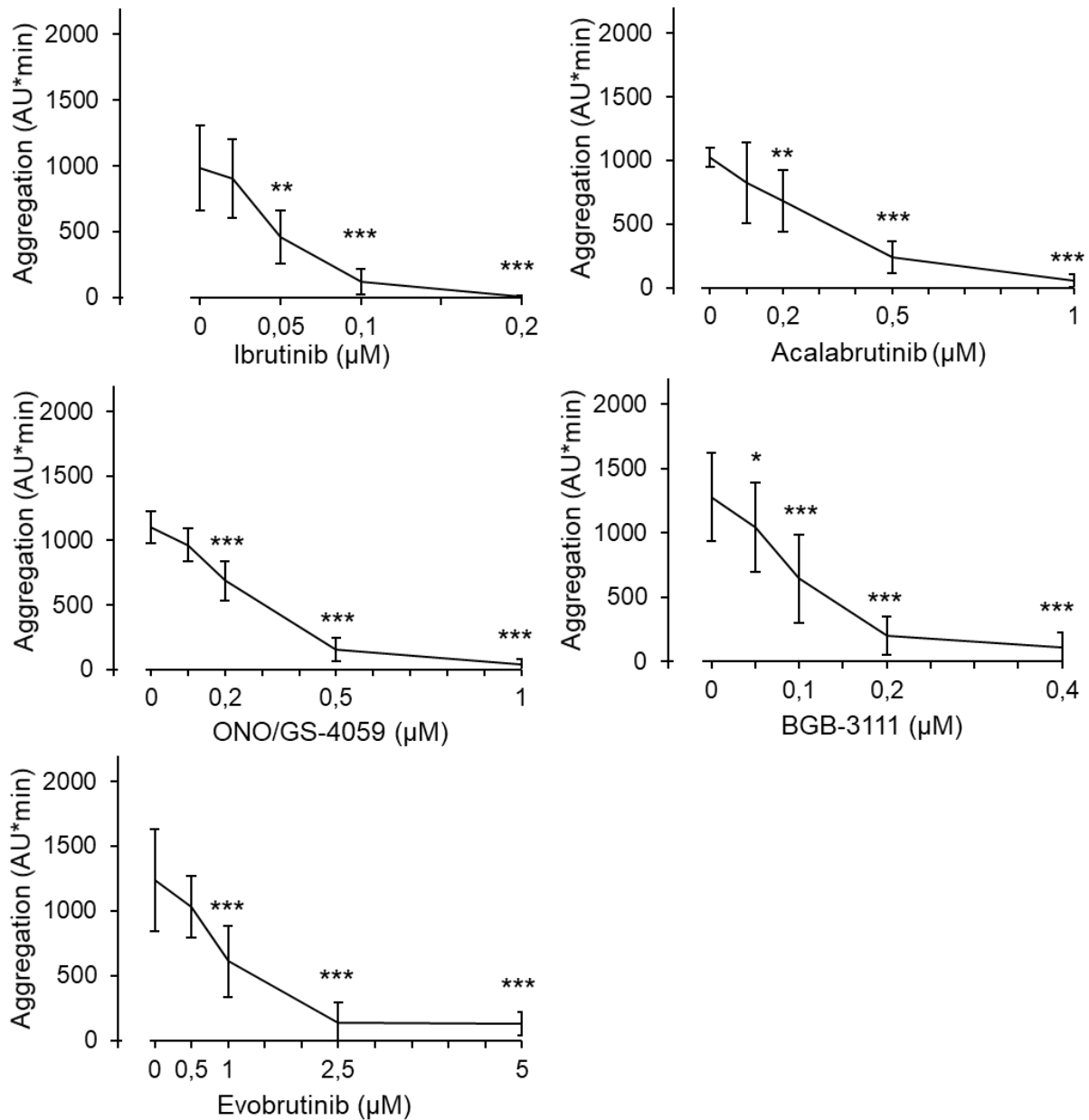


Abb. 13: Wirkung verschiedener Konzentrationen irreversibler Btk-Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation im Blut nach FcγRIIA-Stimulation durch CD9-Antikörper. Die Blutproben wurden für 60 Minuten mit DMSO (0,1%) beziehungsweise mit unterschiedlichen Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-311 und Evobrutinib) inkubiert. Stimuliert wurde mit CD9-Antikörper (1 µg/ml), die Messung dauerte 10 Minuten. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=5). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Die IC₅₀-Werte lagen hier etwas niedriger als nach Aktivierung durch CD32 *cross-linking* (**Tabelle 1**). Dies ist möglicherweise auf die niedrigere Thrombozytenaktivierung durch den CD9-Antikörper zurückzuführen, diese lag im Durchschnitt bei 1177 ± 276 AU*min (n=10), während sie bei CD32 *cross-linking* 1794 ± 226 AU*min (n=11) betrug. Bei beiden Stimuli des FcγRIIA zeigte Ibrutinib die größte Wirksamkeit, gefolgt von BGB-3111 (**Abb. 12, Abb. 13**).

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation, ausgelöst durch den Fc-Rezeptor, mit Btk-Inhibitoren konnte bei beiden Aktivierungswegen über die gesamte Messdauer von 10 Minuten beobachtet werden (**Abb. 14**). Während sie beim CD32 *cross-linking* jedoch von Beginn der Messung an sichtbar war, trat sie beim CD9-Antikörper erst verzögert nach etwa zwei Minuten auf. Die repräsentativen Kurven zeigen außerdem, dass die maximale Aggregation (AU) durch CD9-Antikörper in manchen Fällen sogar über der durch CD32 *cross-linking* lag (**Abb. 14B**). Die geringere AU*min nach 10 min beim CD9-Antikörper ist daher vor allem durch diese Verzögerung bedingt.

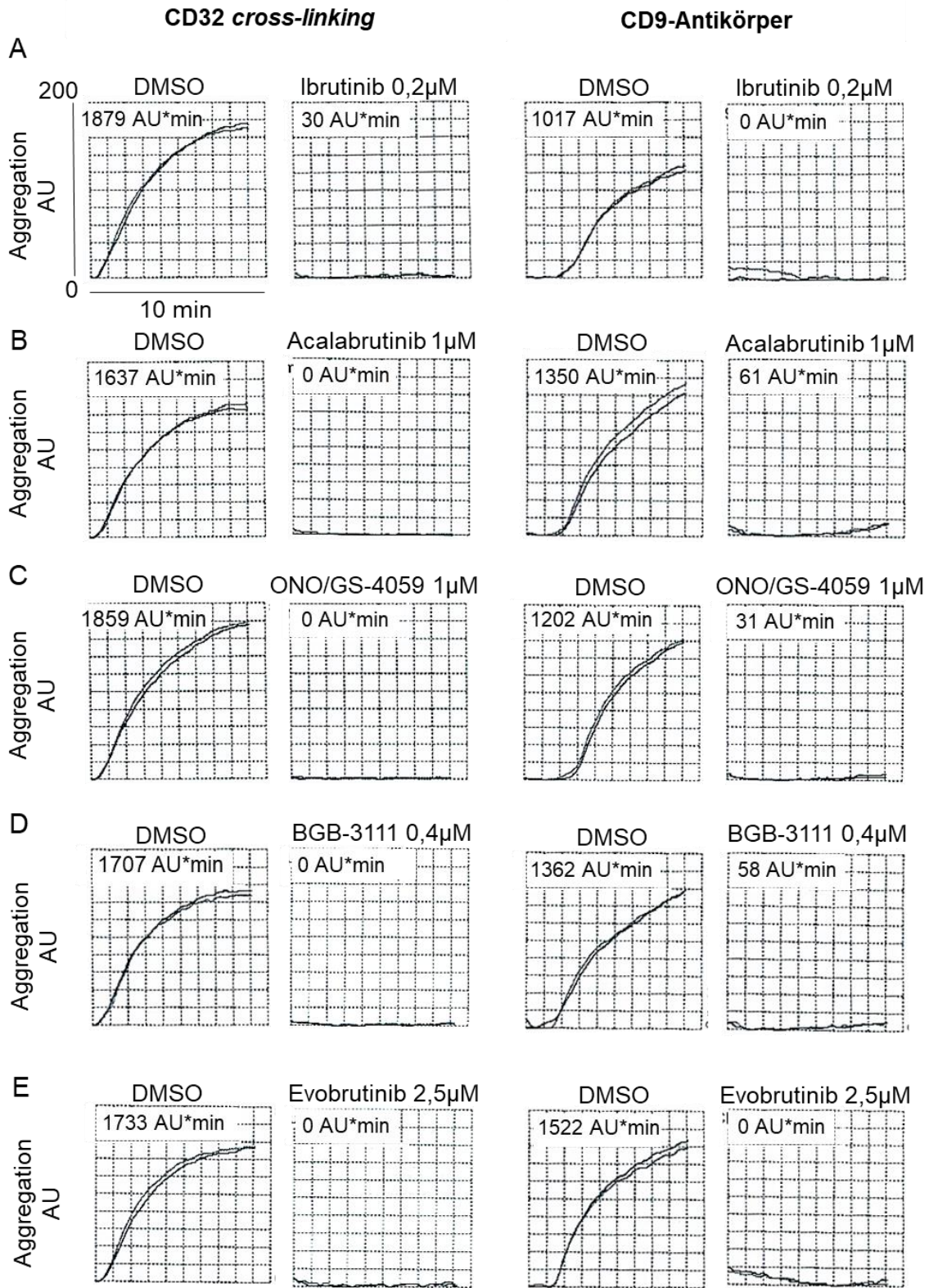


Abb. 14: Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Kinetik der Thrombozytenaggregation im Blut nach FcγRIIA Stimulation. Repräsentative Aggregationskurven. Die Blutproben wurden für 60 Minuten inkubiert mit DMSO (0,1%), beziehungsweise mit unterschiedlichen Btk-Inhibitoren **(A)** Ibrutinib 0,02µM, **(B)** Acalabrutinib 1µM, **(C)** ONO/GS-4059 1µM, **(D)** BGB-311 0,4µM und **(E)** Evobrutinib 2,5µM. Anschließend wurden sie mit anti-CD32 Antikörper AT10 (2µg/ml) und Fab2 anti-mouse IgG (30µg/ml) **(links)**, beziehungsweise mit CD9-Antikörper (1µg/ml) **(rechts)** aktiviert. Die Zahlen über den Kurven stellen die Aggregationswerte über einen Zeitraum von 10 Minuten dar (AU*min).

Die durch CD32 *cross-linking* induzierte Thrombozytenaggregation wurde außerdem durch den reversiblen Btk-Inhibitor GDC-0853 dosisabhängig gehemmt (**Abb. 15A**). GDC-0853 war mit einer IC₅₀ von 11nM der wirksamste getestete Btk-Inhibitor. Er hemmte ebenfalls die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit dem CD9-Antikörper, Ristocetin und niedrigen Konzentrationen Kollagen, aber nicht nach Stimulation mit TRAP, AA, ADP oder höheren Konzentrationen Kollagen (**Abb. 15B**). Da *in vitro* hohe Konzentrationen bestimmter irreversibler Btk-Inhibitoren die primäre Hämostase gemessen mit dem PFA-200® beeinträchtigen können (Denzinger et al. 2019), wurde in dieser Arbeit der Effekt des reversiblen Btk-Inhibitors GDC-0853 auf die Thrombozytenfunktion mit diesem Gerät untersucht. In einer Kollagen/Epinephrin-Kartusche, die auch sensitiv auf Aspirin reagiert (Favaloro 2008), wurde GDC-0853 in deutlich höheren Konzentrationen (bis zu 1000nM) als für die Hemmung des Fc-Rezeptors benötigt (50nM) getestet. Auch in 20-fach höherer Konzentration beeinflusste es jedoch nicht die *in vitro* Verschlusszeit (**Abb. 16**).

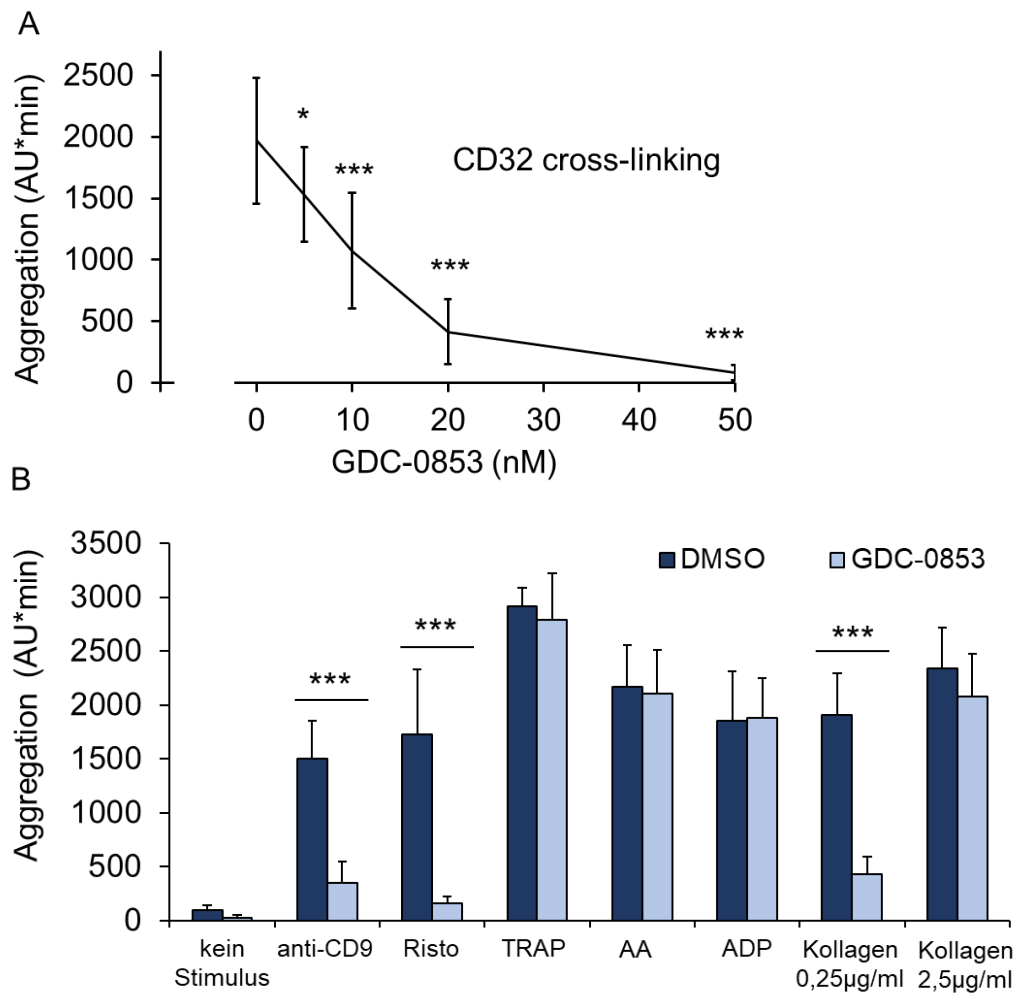


Abb. 15: Wirkung des reversiblen Btk-Inhibitors GDC-0853 auf die Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation durch FcγRIIA-Aktivierung, TRAP, AA und ADP. Die Blutproben wurden für 15 Minuten mit DMSO (0,1%) beziehungsweise mit GDC-0853 vorinkubiert. Anschließend wurde mit AT10 (2µg/ml, 3min) und Fab2 anti-mouse IgG (30µg/ml), beziehungsweise mit CD9-Antikörper (1µg/ml), oder anderen Thrombozytenstimuli aktiviert, bevor die Messung gestartet wurde. Die Messung dauerte 10 Minuten. **(A)** Dosisabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation nach CD32 *cross-linking* durch GDC-0853. **(B)** Wirkung von GDC-0853 (50nM) auf die Thrombozytenaggregation induziert durch CD9-Antikörper (1µg/ml), Ristocetin (0,5mg/ml), TRAP (15µM), ADP (5µM), AA (0,6mM) und Kollagen (0,25µg/ml und 2,5µg/ml). Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=5). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

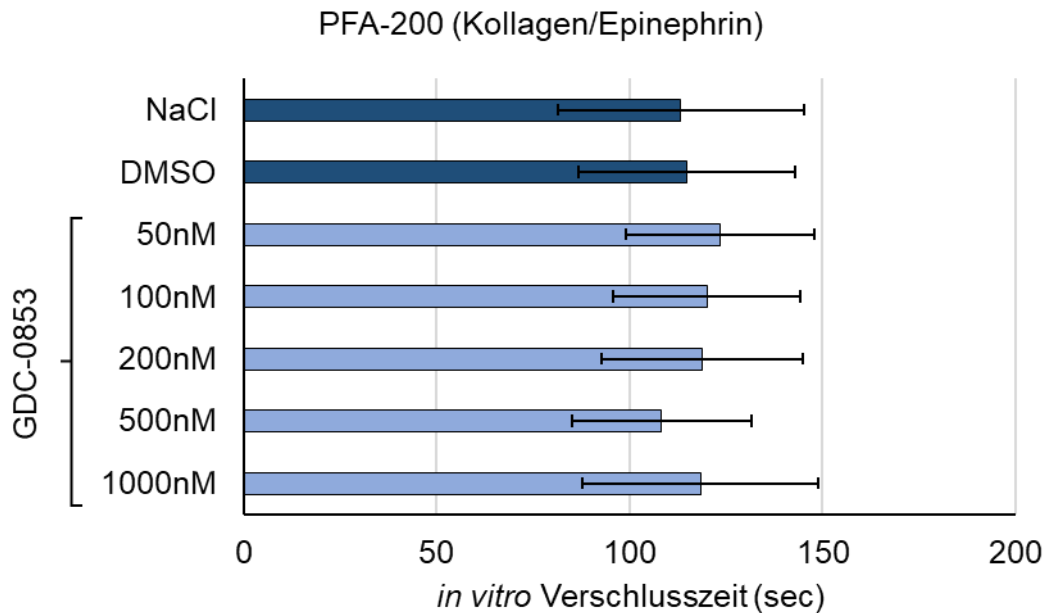


Abb. 16: Effekt von GDC-0853 auf die *in vitro* Blutungszeit. Die Blutproben wurden für 15 Minuten mit NaCl, DMSO (0,1%) oder mit ansteigenden Konzentrationen GDC-0853 bei 37°C inkubiert, anschließend in die Kollagen/Epinephrin-Kartuschen überführt und die *in vitro* Verschlusszeit wurde mit dem PFA-200 gemessen. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=6).

4.3 Einfluss der Inkubationszeit des Blutes mit Btk-Inhibitoren auf die Hemmung der Fc-Rezeptor vermittelten Thrombozytenaggregation

Um den Einfluss der Inkubationszeit zu testen wurden die folgende Konzentrationen der irreversiblen Btk-Inhibitoren, welche nach 60min Inkubation die Fc-Rezeptor induzierte Thrombozytenaggregation nach CD32 *cross-linking* maximal hemmten (siehe **Abb. 12, 13**), verwendet: Ibrutinib (0,2µM), Acalabrutinib (1µM), ONO/GS-4059 (1µM), BGB-3111 (0,4µM) und Evobrutinib (2,5µM). Diese wurden für jeweils 5, 15, 30 und 60 Minuten mit Blut vorinkubiert, bevor der Fc-Rezeptor über CD32 *cross-linking* stimuliert wurde. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation nahm mit der Dauer der Vorinkubation der Btk-Inhibitor zu, die maximale Hemmung wurde nach 30 bis 60 Minuten erreicht (**Abb. 17**).

Die Wirkung des reversiblen Btk-Inhibitors GDC-0853 war dagegen nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten nicht signifikant höher als nach 15 Minuten (**Abb. 18**).

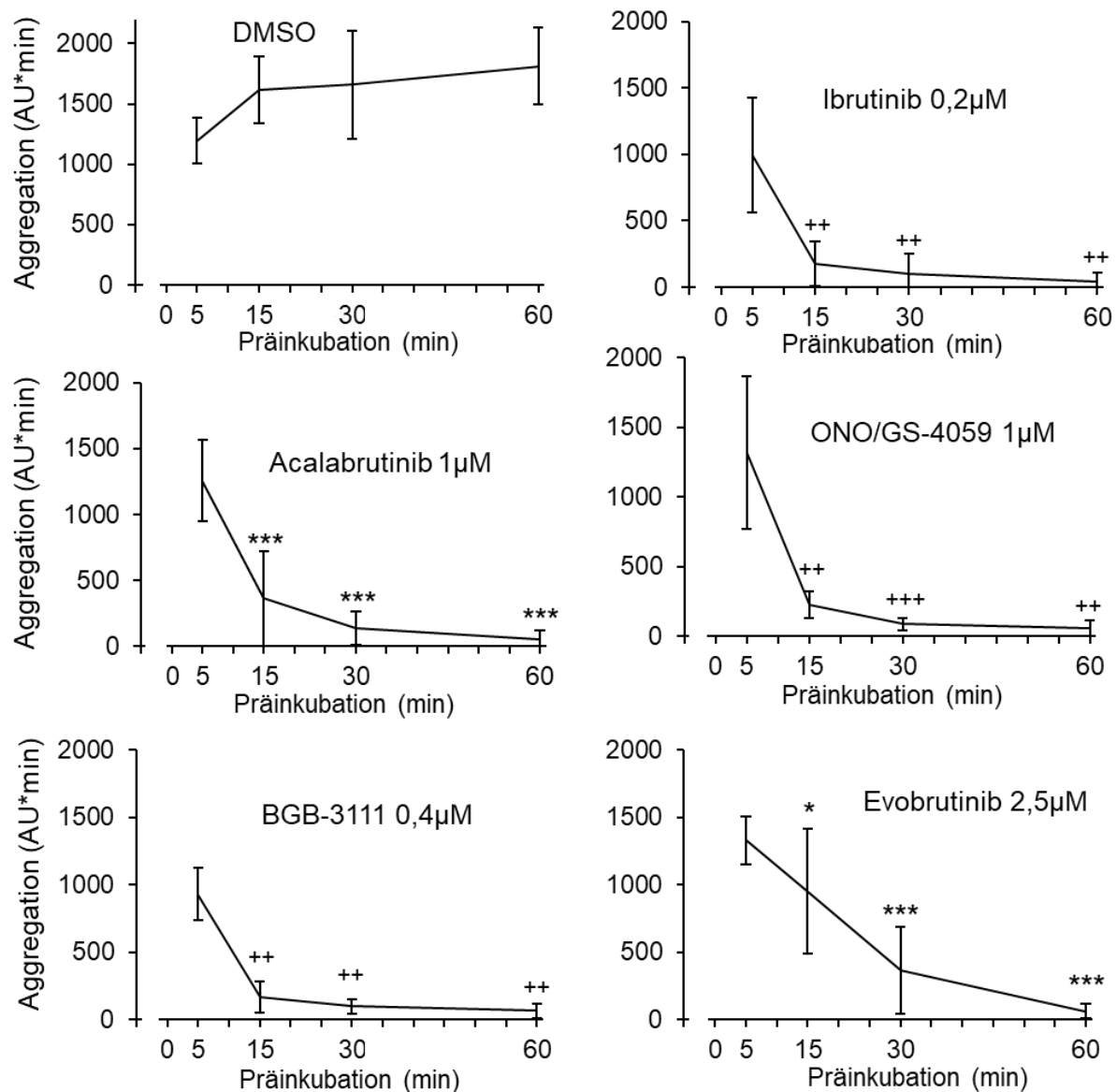


Abb. 17: Auswirkung verschiedener Inkubationszeiten von irreversiblen Btk-Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation nach FcγRIIA-Stimulation durch *cross-linking*. Die Blutproben wurden für 5, 15, 30 und 60 Minuten mit DMSO (0,1%) oder den Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-311 und Evobrutinib) inkubiert, anschließend wurde mit AT10 (2µg/ml, 3min) und Fab2 *anti-mouse* IgG (30µg/ml) stimuliert und für 10 Minuten gemessen. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, +P < 0,05, ++P < 0,01, +++P < 0,001.

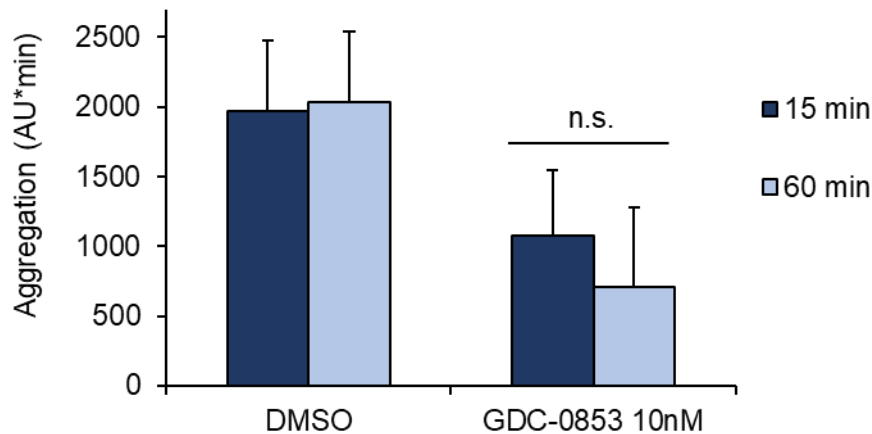


Abb. 18: Auswirkung verschiedener Inkubationszeiten von GDC-0853 auf die Thrombozytenaggregation nach FcγRIIA-Stimulation durch *cross-linking*. Inkubation für 15 und 60 Minuten mit DMSO (0,1%) und GDC-0853 (10nM), anschließend Stimulation mit AT10 und Fab2. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=5). n.s.= nicht signifikant.

4.4 Wirkung von Btk-Inhibitoren auf die Fc-Rezeptor vermittelte thrombozytäre ATP-Sekretion und P-Selektin-Expression sowie die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen

Um zu analysieren, ob die Fc-Rezeptor-Aktivierung auch die Thrombozytensekretion und ihre Interaktion mit anderen Blutzellen beeinflusst, und diese durch Btk-Inhibitoren gehemmt werden kann, wurde die thrombozytäre ATP-Sekretion aus den dichten Granula mittels Lumineszenz und die P-Selektin Sekretion aus alpha-Granula sowie die Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die Fc-Rezeptor-Aktivierung wurde wie oben beschrieben durch CD32 *cross-linking* induziert. Die ATP-Sekretion sowie die P-Selektin-Expression und die Thrombozyten-Neutrophil-Komplex-Bildung in gerührtem und antikoaguliertem Blut war im Vergleich zur Kontrolle ohne Aktivierung deutlich erhöht (**Abb. 11B, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21 B, C**).

Es wurden anschließend die Konzentrationen der Btk-Inhibitoren getestet, die eine maximale Hemmung der Aggregation nach CD32 *cross-linking* gezeigt hatten (**Abb. 12, Abb. 13**). Nach 30-minütiger Vorinkubation mit Ibrutinib (0,2μM), Acalabrutinib (1μM), ONO/GS-4059 (1μM), BGB-3111 (0,4μM) und Evobrutinib (2,5μM) war die ATP-Sekretion und P-Selektin-Expression komplett gehemmt und die Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen um 87% (Evobrutinib) bis maximal 94% (Ibrutinib) reduziert (**Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21 A-C**).

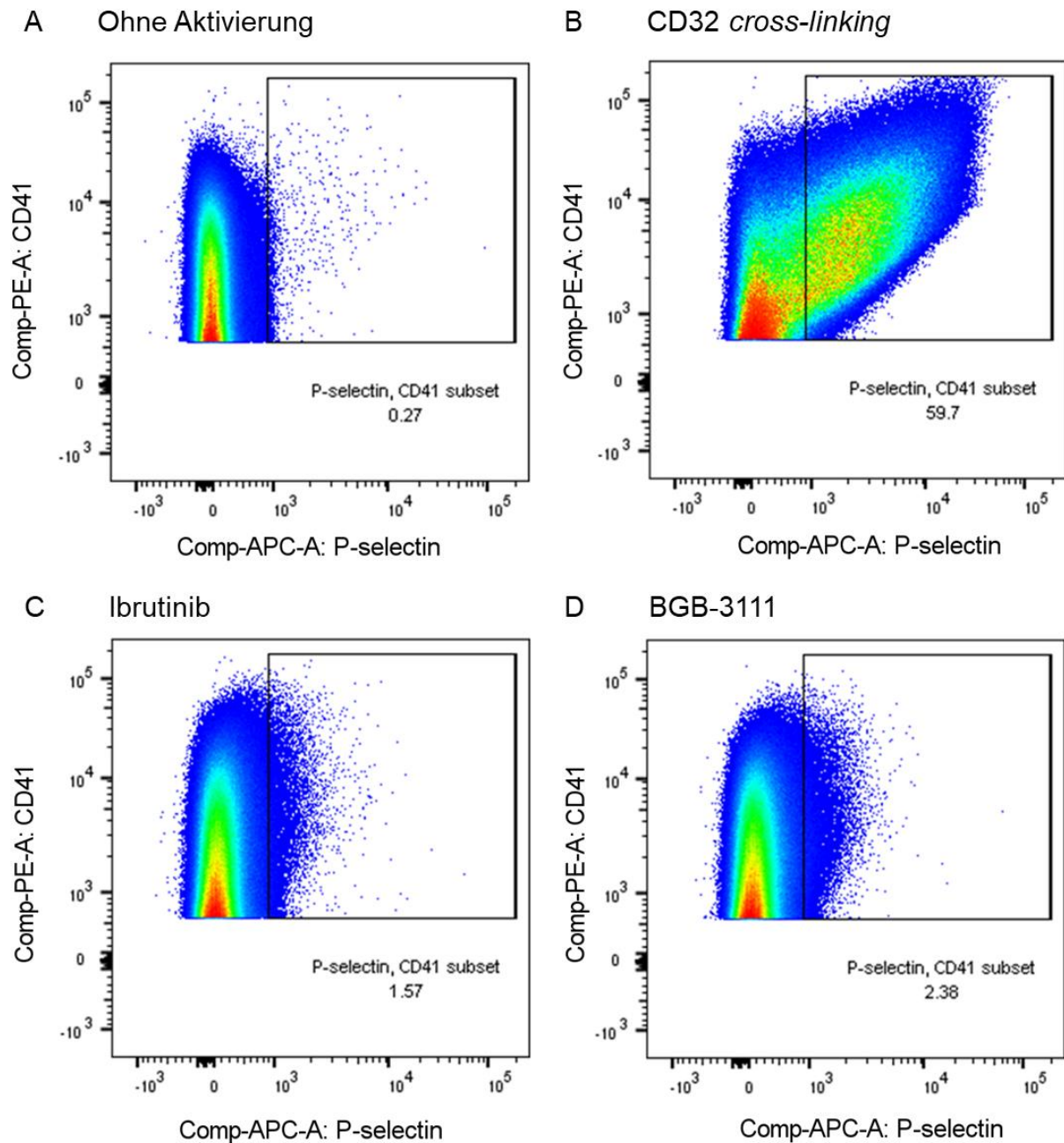


Abb. 19: Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die thrombozytäre P-Selektin-Expression nach FcγRIIA Stimulation im Blut (FACS-dotplot). Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%) bzw. mit den Btk-Inhibitoren für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend für 10 Minuten über CD32 *cross-linking* stimuliert, danach für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur mit den Fluoreszenz-Antikörpern inkubiert und 15 Minuten mit dem RBC-Puffer fixiert, bevor die Messung mit dem FACS Canto II *flow cytometer* gestartet wurde. P-Selektin Expression **(A)** ohne vorausgehende Stimulation, **(B)** nach CD32 *cross-linking*, **(C)** nach Vor-Inkubation mit Ibrutinib (0,2μM), **(D)** BGB-3111 (1μM) und anschließendem CD32 *cross-linking*. Die Werte sind repräsentativ für ein Experiment mit drei gesunden Probanden. Comp-PE-A: CD41: CD41-Antikörper konjugiert mit PE (Phycoerythrin), Comp-APC-A: P-Selektin: CD62P-Antikörper konjugiert mit APC. Die Zahlen unterhalb des markierten Messbereichs bezeichnen den prozentualen Anteil an positiv gemessenen Zellen.

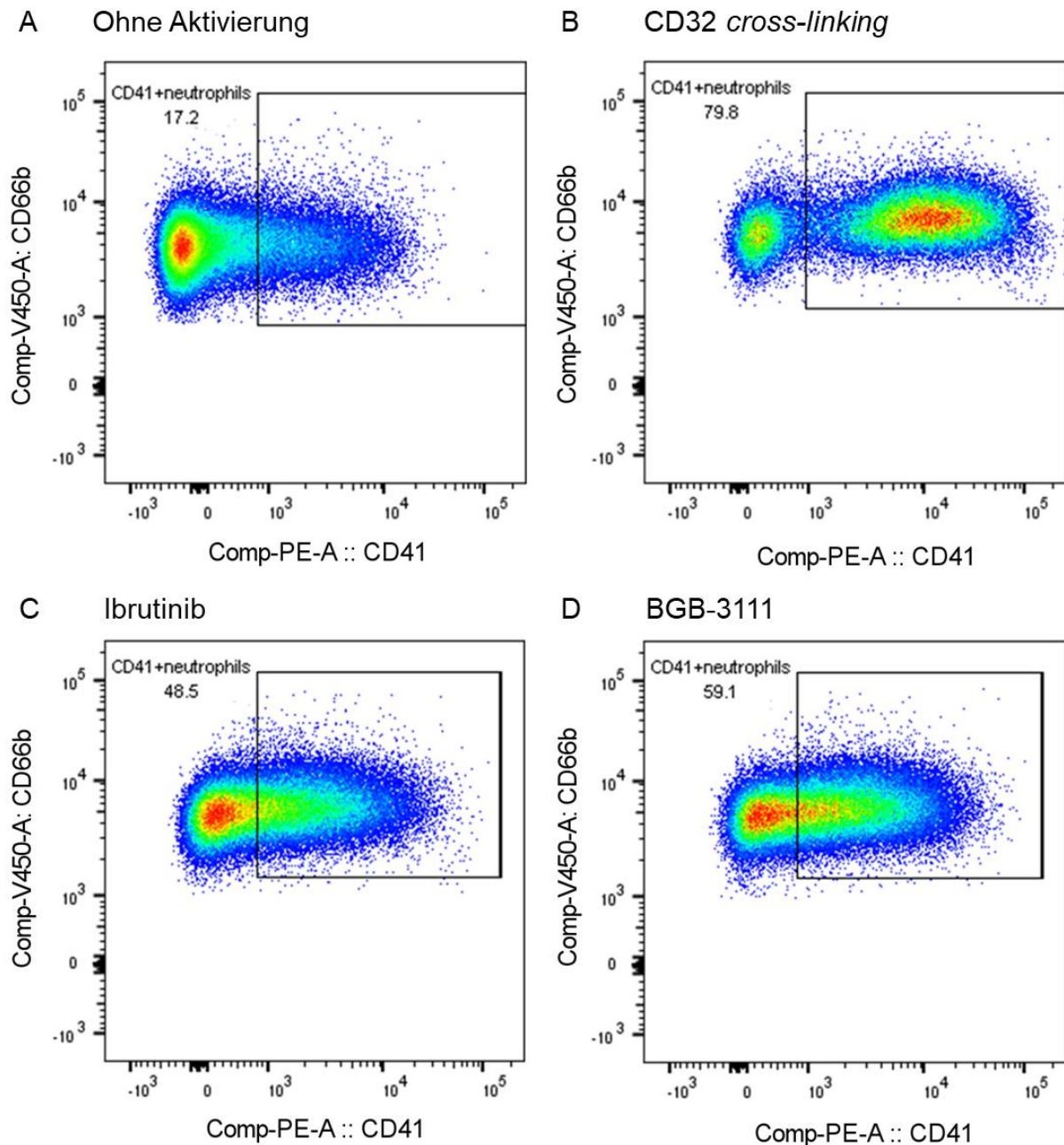


Abb. 20: Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen nach FcγRIIA Stimulation im Blut. (FACS-dotplot) Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%) bzw. mit den Btk-Inhibitoren für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend für 10 Minuten über CD32 *cross-linking* stimuliert, danach für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur mit den Fluoreszenz-Antikörpern inkubiert und 15 Minuten mit dem RBC-Puffer fixiert, bevor die Messung mit dem FACS Canto II flow cytometer gestartet wurde. Neutrophil-Thrombozyten-Komplexe **(A)** ohne vorausgehende Stimulation, **(B)** nach CD32 *cross-linking*, **(C)** nach Inkubation mit Ibrutinib (0,2μM) und CD32 *cross-linking* und **(D)** nach Inkubation mit BGB-3111 (1μM) und CD32 *cross-linking*. Comp-PE-A: CD41: CD41-Antikörper konjugiert mit PE (Phycoerythrin), CompV450-A: CD66b: CD66b-Antikörper konjugiert mit V450. Die Zahlen neben dem markierten Messbereich bezeichnen den prozentualen Anteil an positiv gemessenen Zellen. Die Werte sind repräsentativ für ein Experiment mit drei gesunden Probanden.

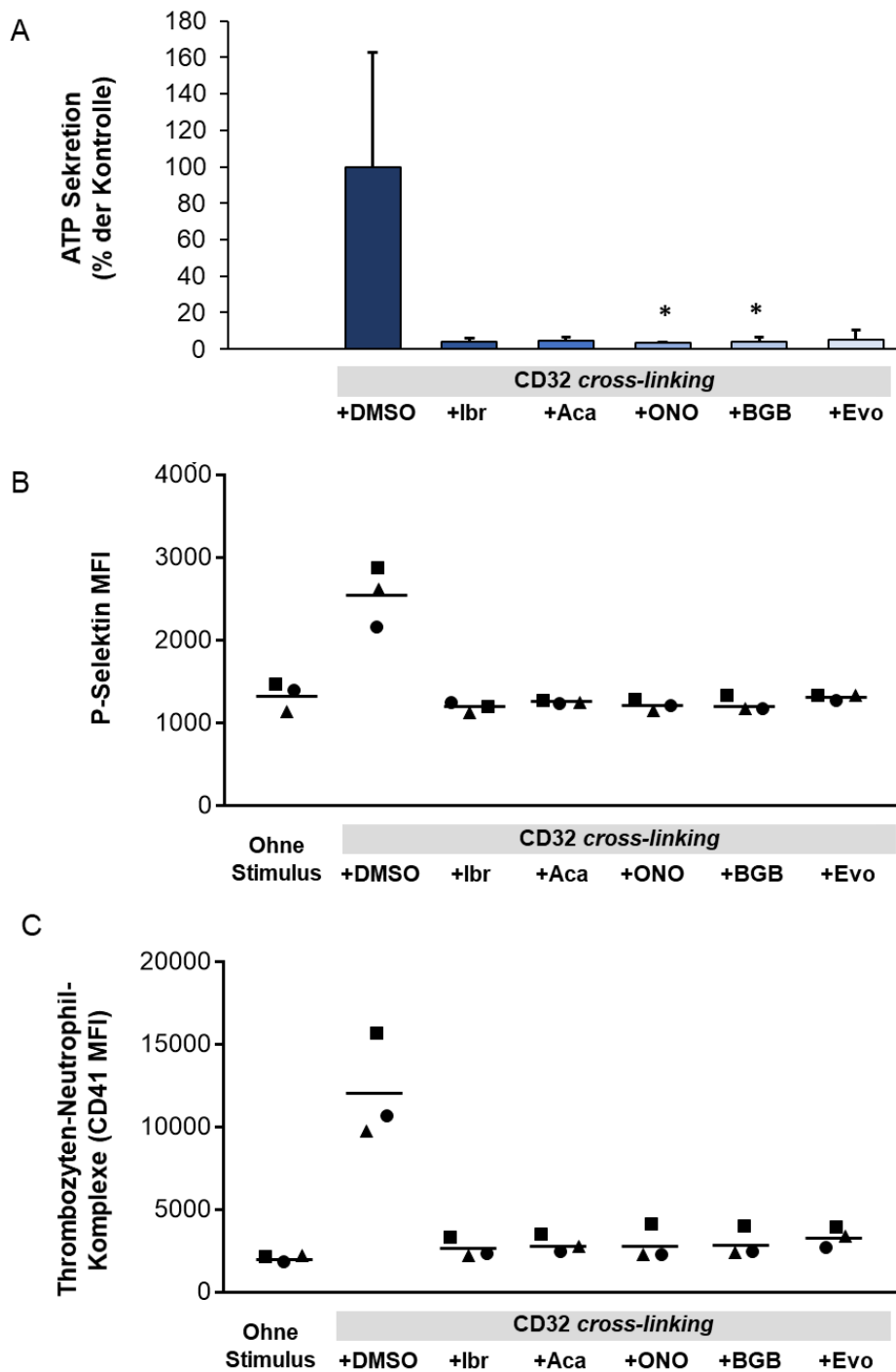


Abb. 21: Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die thrombozytäre ATP-Sekretion, P-Selektin Expression und die Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen nach FcγRIIA Stimulation im Blut. Die Blutproben wurden für 30 Minuten mit DMSO (0,1%) beziehungsweise mit Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) inkubiert, und anschließend wurde mit AT10 (2µg/ml, 3min) und Fab2 anti-mouse IgG (30µg/ml) für 10 Minuten stimuliert. **(A)** Die ATP-Sekretion wurde mithilfe des LUMI-Aggregometer gemessen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=5). *P<0,05 **(B)** Die P-Selektin Expression der Thrombozyten wurde mithilfe der Durchflusszytometrie gemessen. MFI: mittlere Fluoreszenz-Intensität. **(C)** Thrombozyten-Neutrophil-Komplexe wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen, wobei die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von CD41 (auf Thrombozyten) auf CD66b positiven Zellen (neutrophile Granulozyten) bestimmt wurde.

4.5 Wirkung von Btk-Inhibitoren auf die durch HIT-Serum induzierte Thrombozytenaggregation

Es wurden Seren von 28 verschiedenen Patienten mit manifester HIT, welche alle stark positiv im Heparin/PF4-IgG Antikörper Test reagiert hatten, auf ihre Eigenschaft hin, im Blut gesunder Spender eine Thrombozytenaggregation herbeizuführen, untersucht. Bei Zugabe zum Blut gesunder Spender führten 7 der 28 Patienten-Seren (25%) in Anwesenheit von Heparin zur Thrombozytenaggregation. Ohne die Zugabe von Heparin, oder nur mit Heparin, trat keine Aggregation auf (**Abb. 22**).

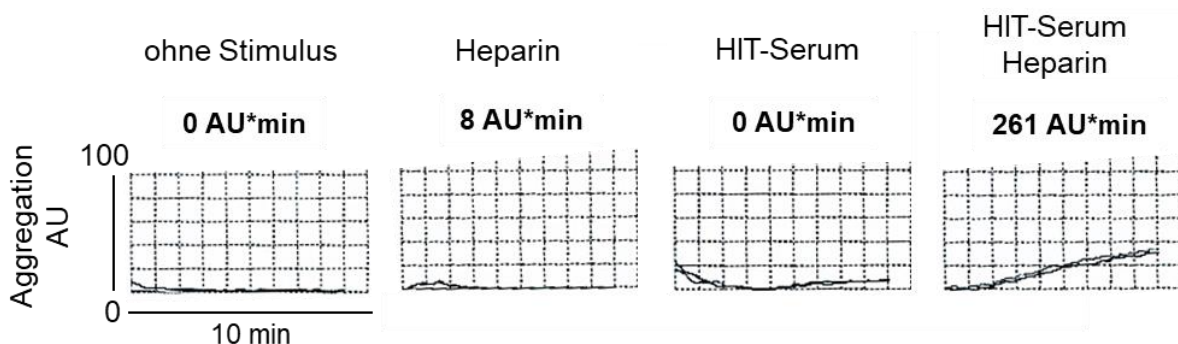


Abb. 22: Thrombozytenaggregation im Blut induziert durch HIT-positives Serum und Heparin. Repräsentative Aggregationskurven. Die Blutproben wurden für 30 Minuten mit oder ohne HIT-Serum (100 µl) vorinkubiert, gefolgt von weiterer 3-minütiger Inkubation mit Heparin (0,5 U/ml) bevor die Messung unter Rühren gestartet wurde. Die Zahlen über den Kurven stellen die Aggregationswerte über einen Zeitraum von 10 Minuten dar (AU*min).

Die Dosis-Wirkungskurve zeigte mit Erhöhung des Serumvolumens (20 µl, 50 µl, 100 µl und 200 µl) eine zunehmende Thrombozytenaggregation (**Abb. 23**). Allerdings löste das HIT-Serum nicht bei allen gesunden Blutspendern eine Thrombozytenaggregation aus. So reagierten zwei (Spender 419 und 416) von zehn Spendern nicht auf das Serum, d.h. die Thrombozytenaggregation war im Vergleich zur Spontanaggregation nach 10 Minuten nicht erhöht (**Tabelle 2**). Diese Spender reagierten jedoch normal auf Aktivierung mit CD32 *cross-linking* oder CD9-Antikörper Stimulation. Die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit HIT-Serum schwankte Spender-abhängig von 161 bis 1342 AU*min (**Tabelle 2**).

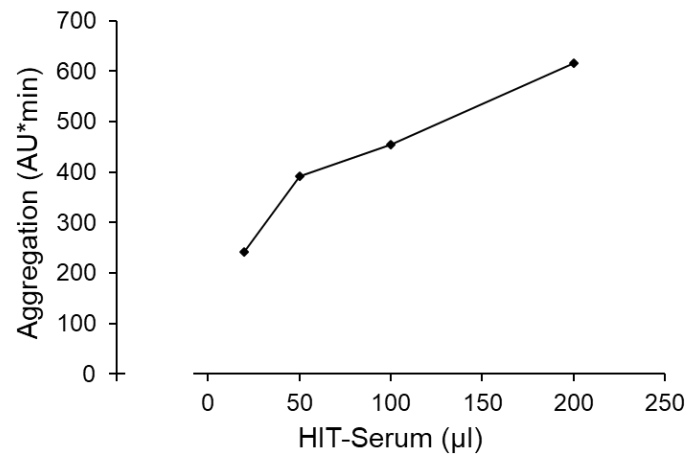


Abb. 23: Die Thrombozytenaggregation im Blut nimmt mit dem eingesetzten Volumen des HIT-Serums zu. Die Blutproben wurden mit zunehmenden Konzentrationen HIT-Serum für 30 Minuten vorinkubiert. Heparin (1U/ml) wurde zugegeben und für weitere 3 Minuten inkubiert, bevor die Messung (10min) nach Zugabe des Rührfisches gestartet wurde. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils n=2 Messungen.

Spender-Nummer	SPA (AU*min)	Heparin + HIT-Serum (AU*min)
418	78	1342
397	0	339,5
355	415,5	741
402	16,5	315,5
277	34,5	550
419	71,5	25
410	63	161,5
416	201,5	195
221	0	210
417	122,5	338,5

Tabelle 2: Variable Thrombozytenaggregation nach Stimulation von Blut gesunder Spender (n=10) mit Heparin und HIT-Serum. Die Spontanaggregation (SPA) wurde nach einer Inkubationszeit des Blutes von 60 Minuten mit DMSO (0,1%) über 10 Minuten gemessen. Die Blutproben wurden für 30 Minuten mit DMSO (0,1%) inkubiert, anschließend für weitere 30 Minuten mit HIT-positivem Serum (100µl). Heparin wurde zugegeben (0,5U/ml) und 3 Minuten inkubiert, bevor die Messung gestartet und für 10 Minuten gemessen wurde. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils n=2 Messungen.

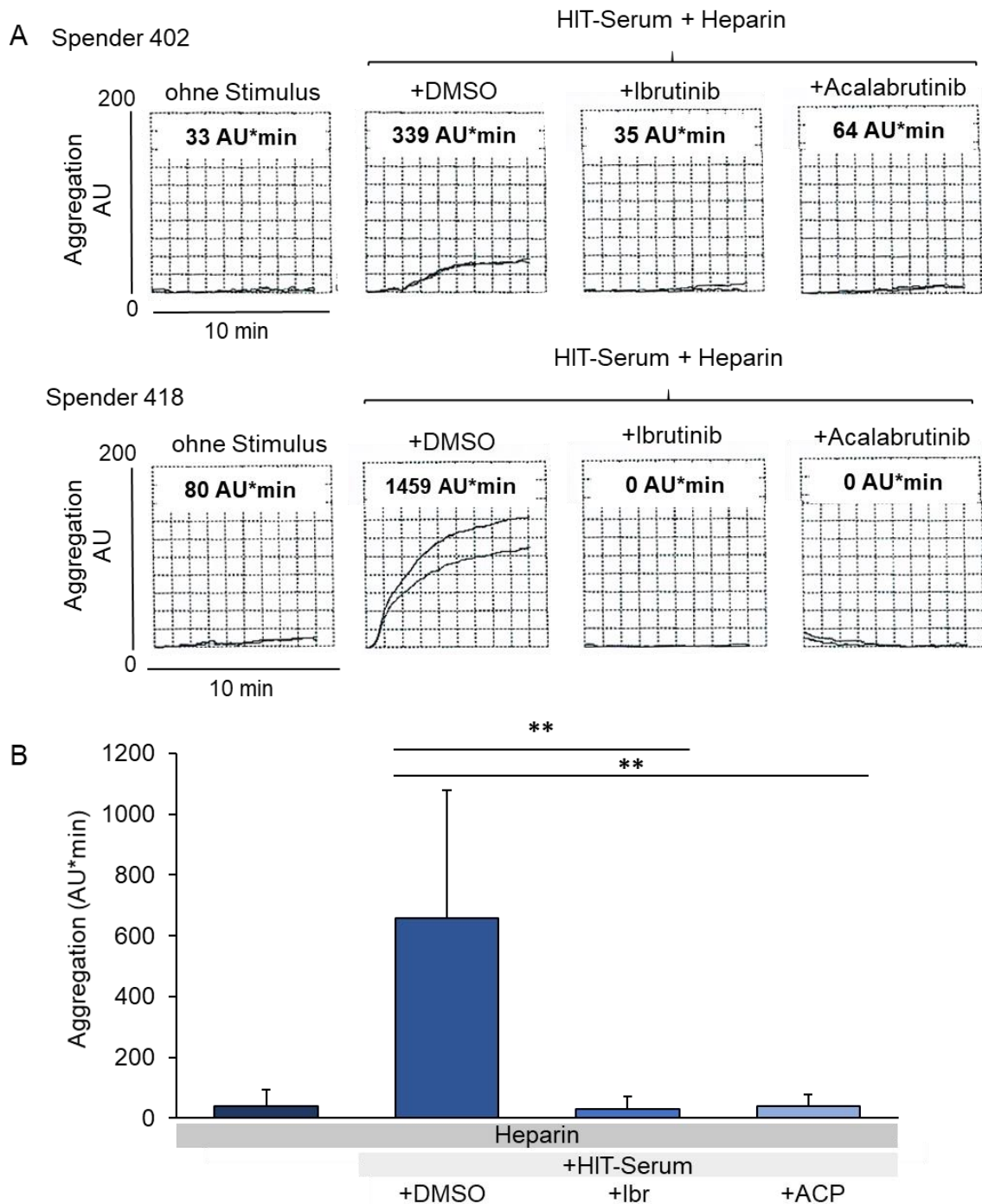


Abb. 24: Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und Acalabrutinib auf die Thrombozytenaggregation im Blut stimuliert durch HIT-Serum und Heparin.

Die Blutproben wurden für 30 Minuten mit DMSO (0,1%) oder den Btk-Inhibitoren Ibrutinib (0,2µM) und Acalabrutinib 1µM inkubiert, anschließend für weitere 30 Minuten mit HIT-positivem Serum (100µl). Heparin wurde zugegeben (0,5U/ml), und nach 3 Minuten wurde die 10-minütige Messung gestartet. **(A)** Repräsentative MEA Kurven gesunder Probanden zeigen unterschiedliche Reaktivitäten auf das HIT-Serum. Die Zahlen über den Kurven zeigen die kumulativen Aggregationswerte (AU*min) nach einer 10-minütigen Messung an. **(B)** Säulendiagramm, die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=5). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Die Btk-Inhibitoren Ibrutinib (0,2 μ M) und Acalabrutinib (1 μ M) hemmten die durch HIT-Serum und Heparin-induzierte Thrombozytenaggregation fast vollständig um jeweils 95% und 93%, unabhängig davon, wie hoch die Thrombozytenaggregation des jeweiligen Spenders war (**Abb. 24B**).

Außer den irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib und Acalabrutinib hemmte auch der reversible Btk-Inhibitor GDC-0853 komplett die Thrombozytenaggregation nach Stimulierung mit verschiedenen HIT-Seren und Heparin. Die Hemmung durch die Btk-Inhibitoren war bei jedem untersuchten HIT-Serum zu beobachten und war auch in Thrombozyten von Spendern mit starker Antwort auf das HIT-Serum komplett (**Tabelle 3**).

	Spender 418	Spender 277	Spender 355
<i>Aggregation (AU*min)</i>			
Kontrolle	149;96	0;30	379;144
Heparin 0,5 U/ml	0;38	49;0	276;174
HIT-Serum W + Heparin	1891;1682	1216	1614;970
Ibrutinib + HIT-Serum W + Heparin	35	0	38
Acalabrutinib + HIT-Serum W + Heparin	40	38	234
GDC-0853 + HIT-Serum W + Heparin	28	0	250
HIT-Serum E + Heparin	1327;1105	229	
Ibrutinib + HIT-Serum E + Heparin	0	41	
Acalabrutinib + HIT-Serum E + Heparin	0	0	
GDC-0853 + HIT-Serum E + Heparin	0	0	
HIT-Serum U + Heparin	784		
Ibrutinib + HIT-Serum U + Heparin	0		
Acalabrutinib + HIT-Serum U + Heparin	30		
GDC-0853 + HIT-Serum U + Heparin	95		
HIT-Serum G + Heparin			750
Ibrutinib + HIT-Serum G + Heparin			149
Acalabrutinib + HIT-Serum G + Heparin			134
GDC-0853 + HIT-Serum G + Heparin			87

Tabelle 3: Effekt der irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib und Acalabrutinib sowie des reversiblen Btk-Inhibitors GCD-0853 auf die Thrombozytenaggregation im Blut induziert durch HIT-Serum und Heparin. Die Blutproben drei verschiedener reaktiver Spender wurden für 30 Minuten entweder mit DMSO (0,1%) oder den Btk-Inhibitoren (Ibrutinib 0,2µM, Acalabrutinib 1µM, GCD-0853 50nM) und anschließend weitere 30 Minuten mit HIT-positivem Serum (100µl) verschiedener Patienten (W,E,U,G) inkubiert. Danach wurde Heparin zugegeben (0,5U/ml) und für 3 Minuten inkubiert bevor die Messung gestartet wurde. Die Werte entsprechen den kumulativen Aggregationswerte (AU*min) nach einer 15-minütigen Messung.

4.6 Wirkung der oralen Einnahme einer Einzeldosis Ibrutinib auf die Fc-Rezeptor-induzierte Thrombozytenaktivierung

Es wurde in einem *ex vivo* Versuch getestet, ob Ibrutinib nach oraler Einnahme die Fc-Rezeptor-induzierte Thrombozytenaktivierung hemmt, und ob eine einzelne Dosis des irreversiblen Btk-Inhibitors bereits zu einer hinreichenden Thrombozytenhemmung in der akuten Phase einer HIT (d.h. in den ersten Tagen) führen könnte. Drei gesunde männliche Probanden (A, B, C) nahmen eine Einzeldosis Ibrutinib ein (2x140 mg). Drei Stunden nach der Einnahme war bei den Spendern A, B, C die Thrombozytenaggregation induziert durch CD32 *cross-linking* um jeweils 96%, 92%, 98% und bei der Stimulation durch CD9-Antikörper um 97%, 68%, 96% gehemmt.

Die beinahe komplette Hemmung der FcγRIIA-induzierten Thrombozytenaggregation durch CD32 *cross-linking* und CD9-Antikörper hielt bei den Probanden A und C zwei Tage lang an und war erst am siebten Tag nach Ibrutinib-Einnahme rückgängig (**Abb. 25**). Bei Spender B war die Hemmung durch Ibrutinib weniger stark ausgeprägt.

Die Hemmung der FcγRIIA-induzierten ATP-Sekretion durch die Ibrutinib Einnahme war noch deutlicher ausgeprägt. Bei allen drei Spendern war die ATP-Sekretion durch CD32 *cross-linking* drei Stunden, einen und zwei Tage nach der Ibrutinib-Einnahme komplett gehemmt und bei 2 Spendern nach sieben Tagen immer noch erniedrigt (**Abb. 26**).

Die primäre Hämostase wurde bei Spender B mit dem PFA-200® gemessen. Bei der Kollagen/Epinephrin-Kartusche war ein geringfügiger Anstieg der *in vitro* Verschlusszeit nur drei Stunden nach Ibrutinib-Einnahme erkennbar. Die Verschlusszeit gemessen mit der Kollagen/ADP-Kartusche war unverändert (**Abb. 27**).

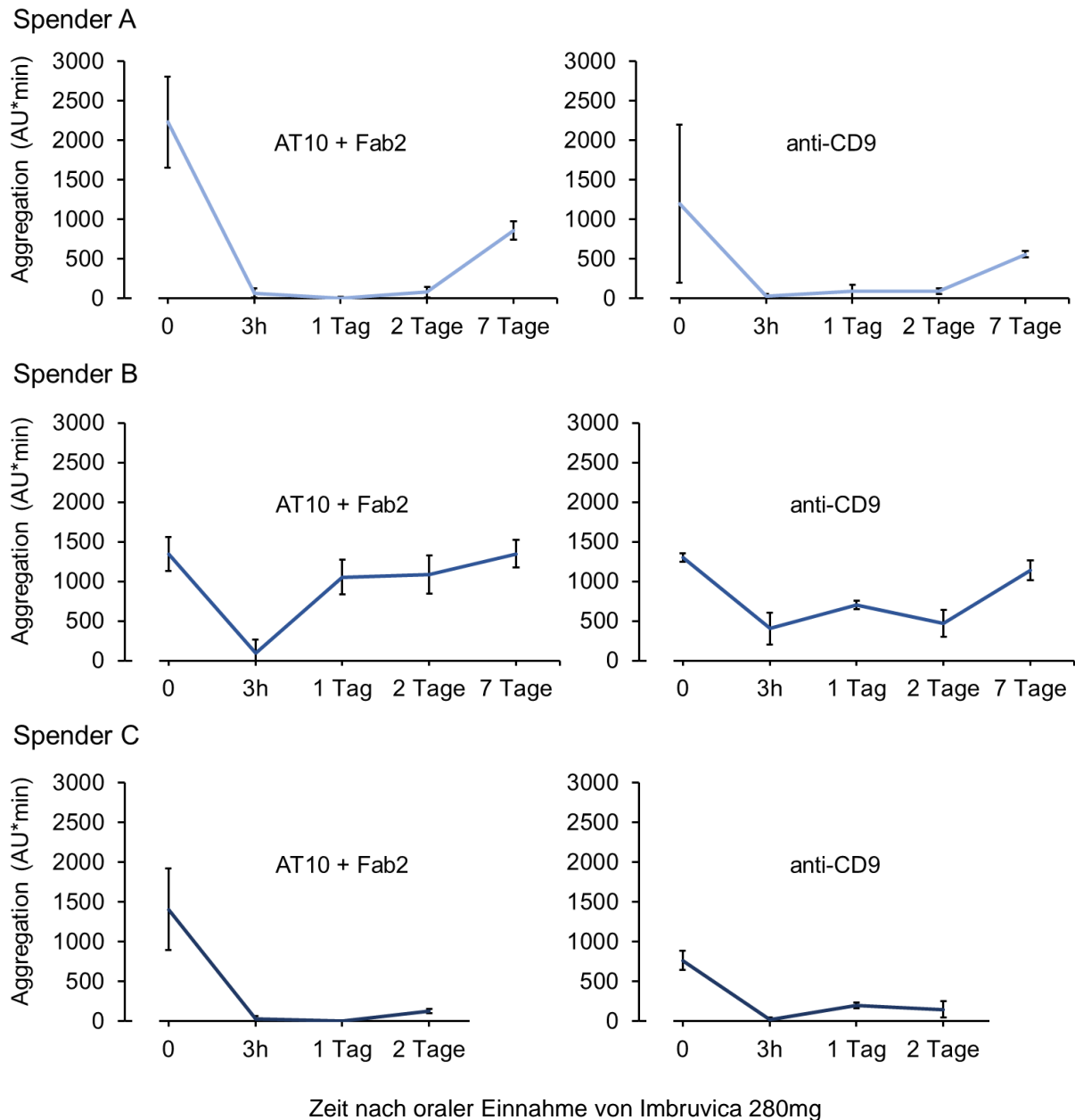


Abb. 25: Wirkung der oralen Einnahme einer Dosis Ibrutinib auf die Thrombozytenaggregation nach FcγRIIA-Stimulation. Drei gesunde Ärzte A, B und C nahmen eine Dosis Imbruvica (2x140mg) ein. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor der Einnahme, drei Stunden danach, und einen Tag, zwei Tage, und eine Woche danach. Die Blutproben wurden 3 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor die Thrombozyten durch CD32 *cross-linking* und CD9-Antikörper (siehe Legende zu Abb. 3 und 5) stimuliert wurden. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD nach dreifacher Testung (n=3).

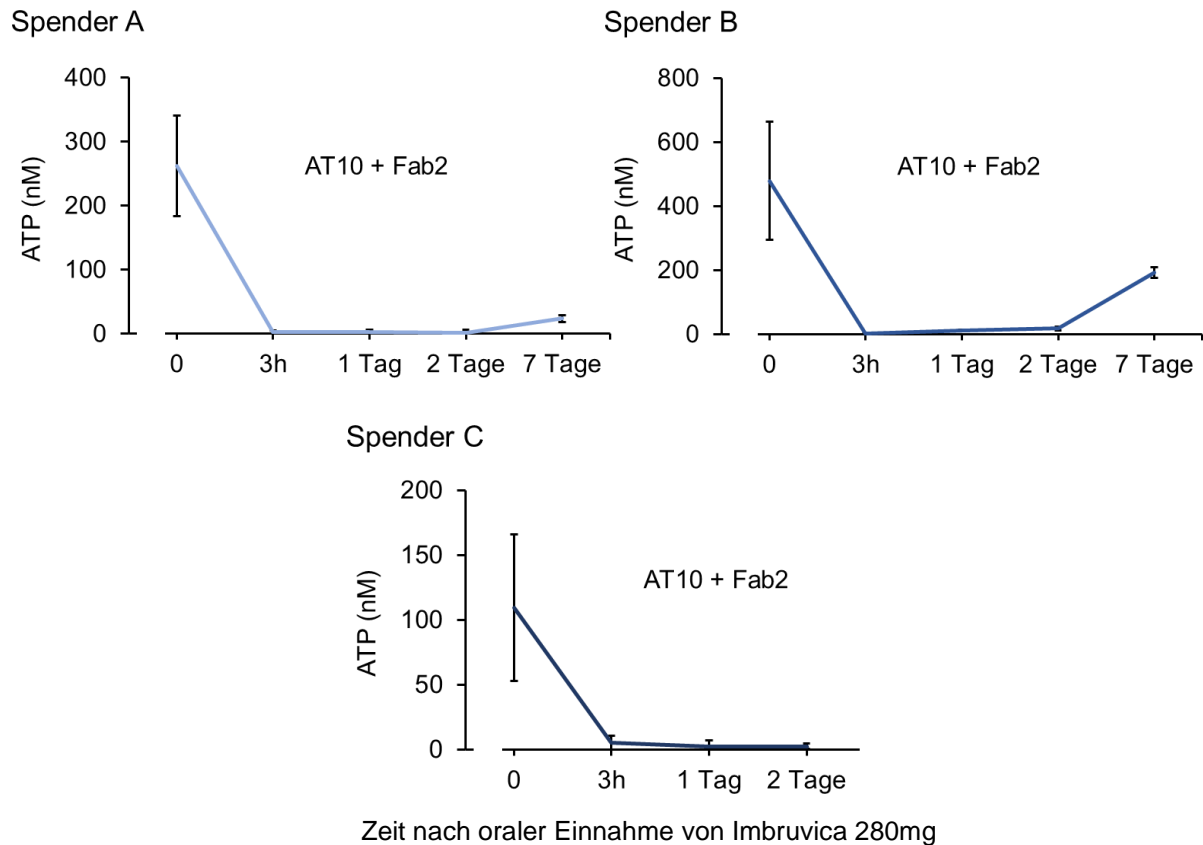


Abb. 26: Wirkung der oralen Einnahme einer Dosis Ibrutinib auf die thrombozytäre ATP-Sekretion nach FcγRIIA-Stimulation. Drei gesunde Ärzte A, B und C nahmen eine Dosis Imbruvica (2x140mg) ein. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor der Einnahme, drei Stunden danach, und einen Tag, zwei Tage und eine Woche danach. Die Blutproben wurden 3 Minuten vorinkubiert, bevor der Fc-Rezeptor durch CD32 *cross-linking* stimuliert wurde. Die ATP-Sekretion wurde mithilfe des LUMI-Aggregometer gemessen. Die ATP-Bestimmung (nM) erfolgte bei jeder Messung durch Zugabe von ATP-Standardlösungen zum Blut. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachmessungen ($n=3$).

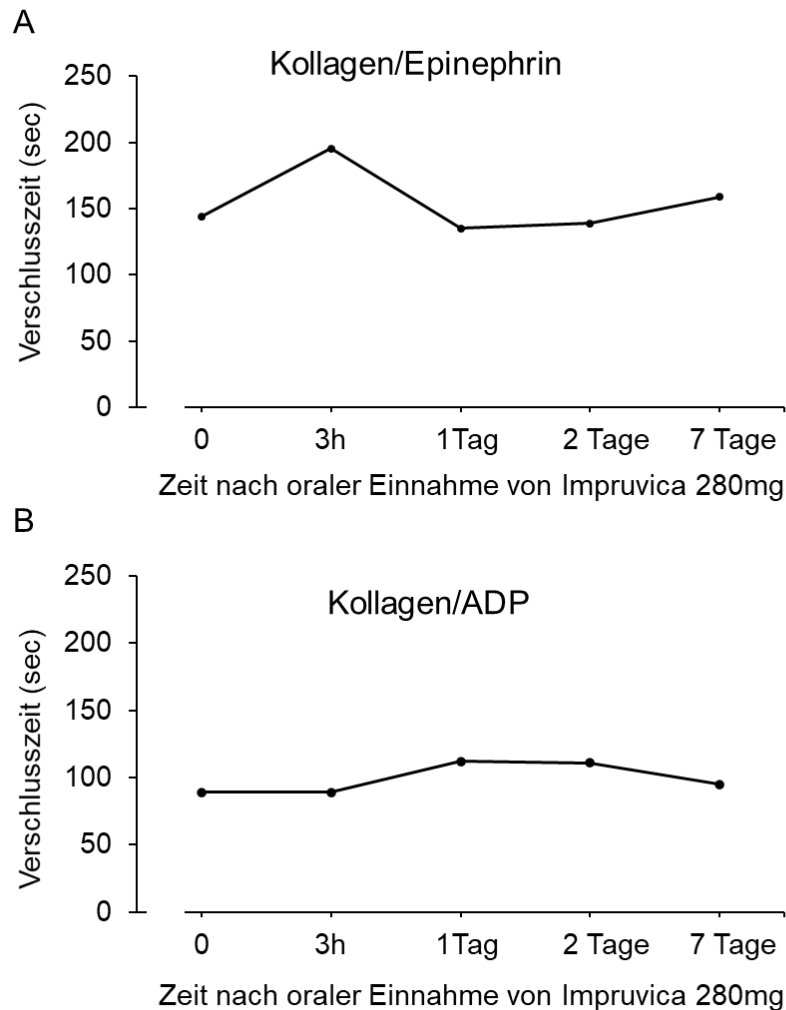
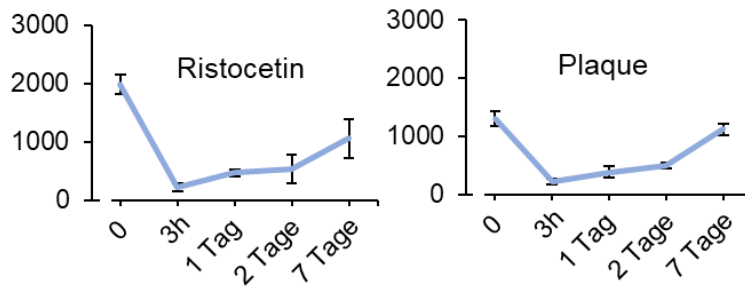


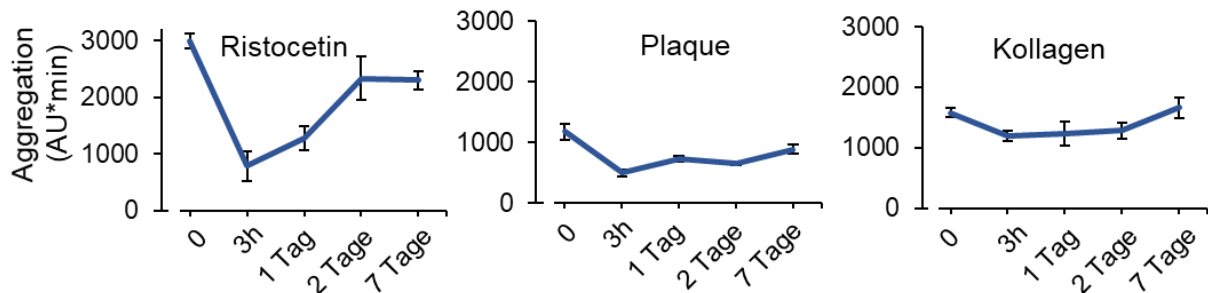
Abb. 27: Effekt einer einzelnen oral verabreichten Dosis Ibrutinib (280mg) von Spender B auf die *in vitro* Blutungszeit. Die Abnahme von Citratblut erfolgte kurz vor der Einnahme einer Dosis Imbruvica (2x140mg), drei Stunden danach, und einen Tag, zwei Tage, und eine Woche danach. Die Blutproben wurden in Kollagen/Epinephrin und in Kollagen/ADP-Kartuschen überführt und die *in vitro* Verschlusszeit mit dem PFA-200 gemessen.

Die GPIIb/vWF-vermittelte Thrombozytenaggregation durch Stimulation mit Ristocetin war drei Stunden nach Ibrutinib-Einnahme in allen drei Spendern gehemmt. Die Hemmung hielt unterschiedlich lange an, bei Spender B lediglich einen Tag, bei Spender A war auch nach einer Woche noch eine Hemmung zu sehen (**Abb. 28**). Die Hemmung der Btk-abhängigen Thrombozytenaggregation nach GPVI-Aktivierung durch Plaque-Stimulation hielt bei allen Spendern bis zwei Tage nach Ibrutinib-Einnahme an. Die Thrombozytenaggregation ausgelöst durch hohe Dosen Kollagen (2,5 µg/ml) war bei Spender B gar nicht und bei Spender C nur drei Stunden nach Ibrutinib-Einnahme gehemmt.

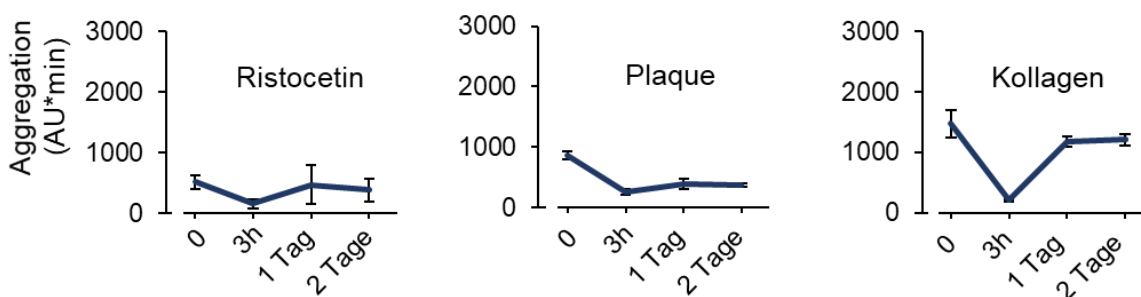
Spender A



Spender B



Spender C

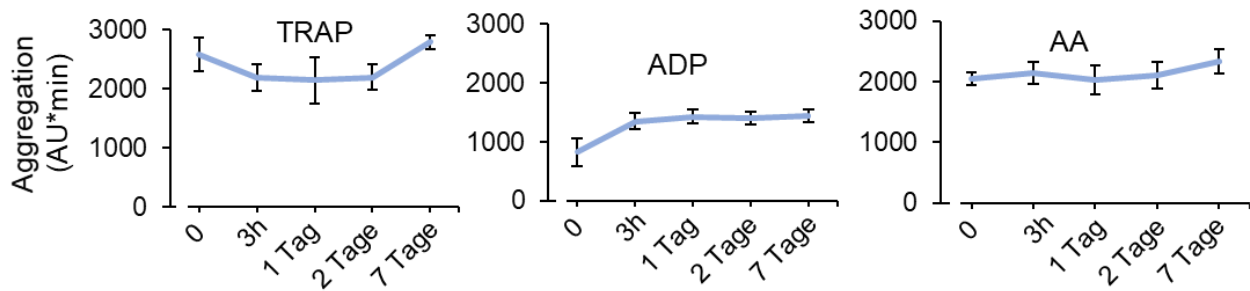


Zeit nach oraler Einnahme von Imbruvica 280mg

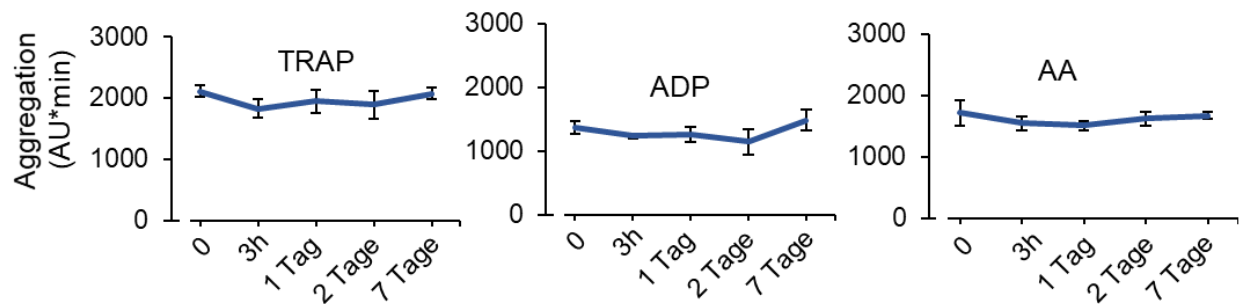
Abb. 28: Wirkung der oralen Einnahme einer Dosis Ibrutinib auf die Thrombozytenstimulation durch Ristocetin, Plaque und Kollagen. Drei gesunde Ärzte A, B und C nahmen eine Dosis Imbruvica (2x140mg) ein. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor der Einnahme, drei Stunden danach, und einen Tag, zwei Tage, und eine Woche danach. Die Blutproben wurden 3 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor die Thrombozyten mit Ristocetin (0,5mg/ml), Plaquehomogenat (0,4mg/ml) und Kollagen (2,5µg/ml) stimuliert wurden. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD nach dreifacher Testung (n=3).

Die Thrombozytenaggregation induziert durch TRAP, AA oder ADP wurde durch die Einnahme von Ibrutinib nicht gehemmt und war in allen drei Spendern über den gesamten Zeitraum messbar (**Abb. 29**).

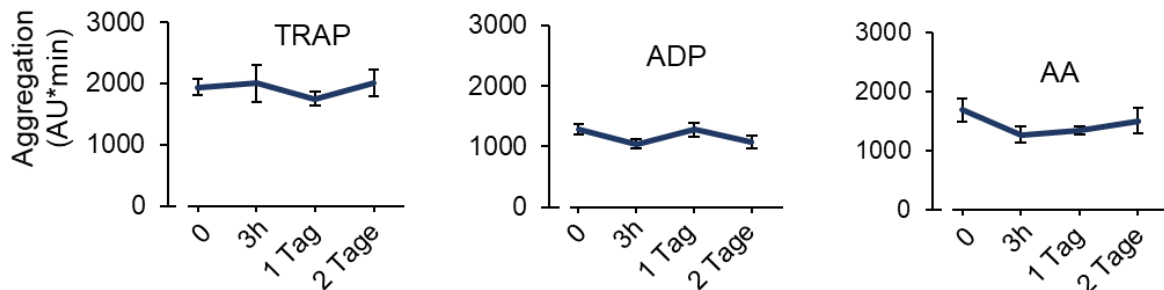
Spender A



Spender B



Spender C



Zeit nach oraler Einnahme von Imbruvica 280mg

Abb. 29: Wirkung der oralen Einnahme einer Dosis Ibrutinib auf die Thrombozytenstimulation durch TRAP, ADP und AA. Drei gesunde Ärzte A, B und C nahmen eine Dosis Imbruvica (2x140mg) ein. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor der Einnahme, drei Stunden danach, und einen Tag, zwei Tage, und eine Woche danach. Die Blutproben wurden 3 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor die Thrombozyten mit TRAP (15µM), Arachidonsäure (AA) (0,6mM) und ADP (5µM) stimuliert wurden. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD nach dreifacher Testung (n=3).

4.7 Hemmung der Spontanaggregation (SPA) durch CD32-Antikörper, Btk-Inhibitoren und humane Fc-IgG Antikörper

Bei einigen Spendern (n=16) trat bei der Messung der Thrombozytenaggregation am Multiplate®, ohne Zugabe von Stimulanzien, eine erhöhte Spontanaggregation nach 10 Minuten Messzeit auf. Diese war bei den jeweiligen Spendern konsistent in allen Versuchen zu beobachten, auch an unterschiedlichen Messtagen. Die erhöhte SPA war somit Spender-abhängig. Das Ausmaß der SPA hat nur geringfügig geschwankt. Als erhöhte SPA wurden dabei alle Werte bezeichnet, die über 250 AU*min nach 10 Minuten Messzeit lagen. Die SPA bei den 9 Probanden lag im Bereich von 250-767 AU*min. Die Aggregation stieg dabei erst nach 3-4 Minuten deutlich an (**Abb. 30**).

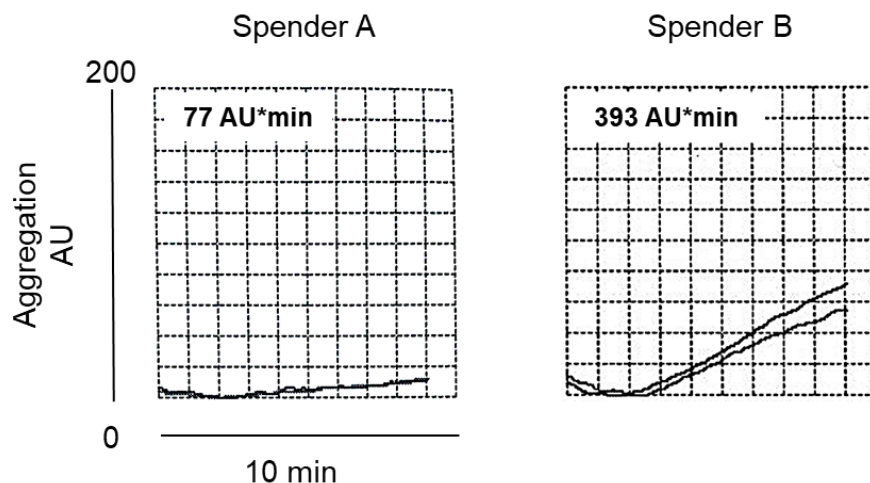


Abb. 30: Normale und erhöhte Spontanaggregation (SPA). Die Blutproben wurden für 3 Minuten ohne Rühren bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Rührer zugegeben und die Messung gestartet, die Thrombozytenaggregation wurde ohne Zugabe eines Stimulus für 10 Minuten gemessen. Repräsentative Tracings zeigen bei Spender A keine erhöhte SPA, bei Spender B eine deutliche erhöhte SPA, welche nach 3 Minuten beginnt.

Um herauszufinden, wodurch die erhöhte Spontanaggregation (SPA) verursacht wurde, wurde das Hirudin-antikoagulierte Blut von 9 dieser Spendern mit verschiedenen Hemmsubstanzen (Aspirin, P2Y₁₂-Antagonisten, Ketanserin (5-HT_{2A} Rezeptor Antagonist), LPA₅ Rezeptorantagonisten, Hirudin in sehr hohen Konzentrationen, der GPVI-Antikörper 5C4, GPVI-Fc, oder dem CD32-Antikörper IV.3 inkubiert). Es wurde gefunden, dass nur der CD32-Antikörper die Spontanaggregation reduzierte (um 78%). Das bedeutet, dass der thrombozytäre Fc-Rezeptor für die erhöhte Spontanaggregation mitverantwortlich ist (**Abb. 31**).

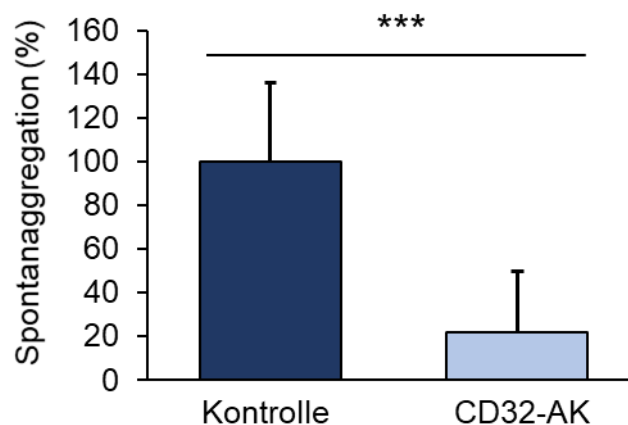


Abb. 31: Wirkung des CD32-Antikörper IV.3 auf die erhöhte Spontanaggregation (SPA) von Thrombozyten. Die Blutproben von Probanden (n=9) mit erhöhter SPA (289-767 AU*min) wurden 3 Minuten ohne (Kontrolle) oder mit dem CD32 Antikörper (AK) IV.3 (2µg/ml) inkubiert, anschließend wurde der Rührfisch (Rührkern) in die Messküvette gegeben, und die Messung gestartet. Die Thrombozytenaggregation wurde für 10 Minuten gemessen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=9). ***P < 0,001.

Aufgrund der Erkenntnis, dass der Fc-Rezeptor für die Spontanaggregation wichtig ist wurde angenommen, dass sie durch Btk-Inhibitoren hemmbar sein sollte. Tatsächlich war die SPA durch die Inkubation mit dem reversiblen Btk-Inhibitor GDC-0853 (50nM) verringert (**Abb. 32**). Bei diesen Messungen war die SPA messbar, jedoch entsprechend unserer Definition nicht erhöht ($97,9 \pm 39,8$ AU*min, MW \pm SD). Auch nach Einnahme einer Einzeldosis Ibrutinib (2x140 mg) war bei drei gesunden männlichen Probanden (A, B, C) die nicht erhöhte SPA ebenfalls verringert. Drei Stunden nach der Einnahme war sie bei zwei Probanden (A und B) komplett und beim dritten Probanden stark gehemmt (**Abb. 33**). Einen Tag nach der Einnahme war die Hemmung bereits abgeschwächt.

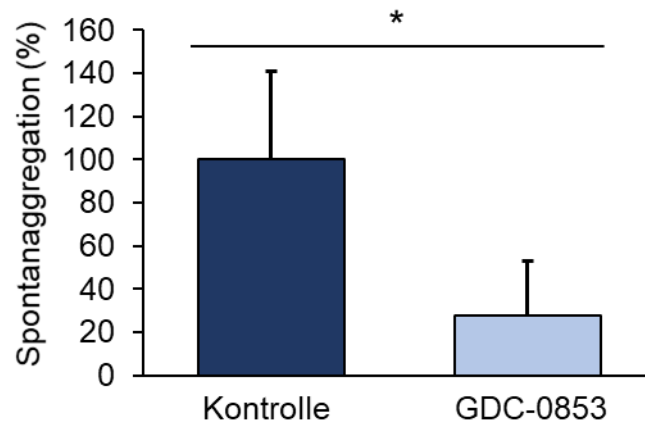


Abb. 32: Wirkung des Btk-Inhibitors GDC-0853 auf die Spontanaggregation von Thrombozyten.

Die Blutproben wurden für 15 Minuten mit DMSO (0,1%) bzw. mit GDC-0853 (50nM) inkubiert, anschließend wurde der Rührfisch (Rührkern) in die Messküvette gegeben, und die Messung gestartet. Die Thrombozytenaggregation wurde für 10 Minuten gemessen. Die Werte sind Mittelwerte (in % der Kontrolle) \pm SD (n=5). Die SPA Werte lagen im Bereich von 59 bis 150,5 AU*min, mit einem Mittelwert von 97,9 AU*min. *P < 0,05.

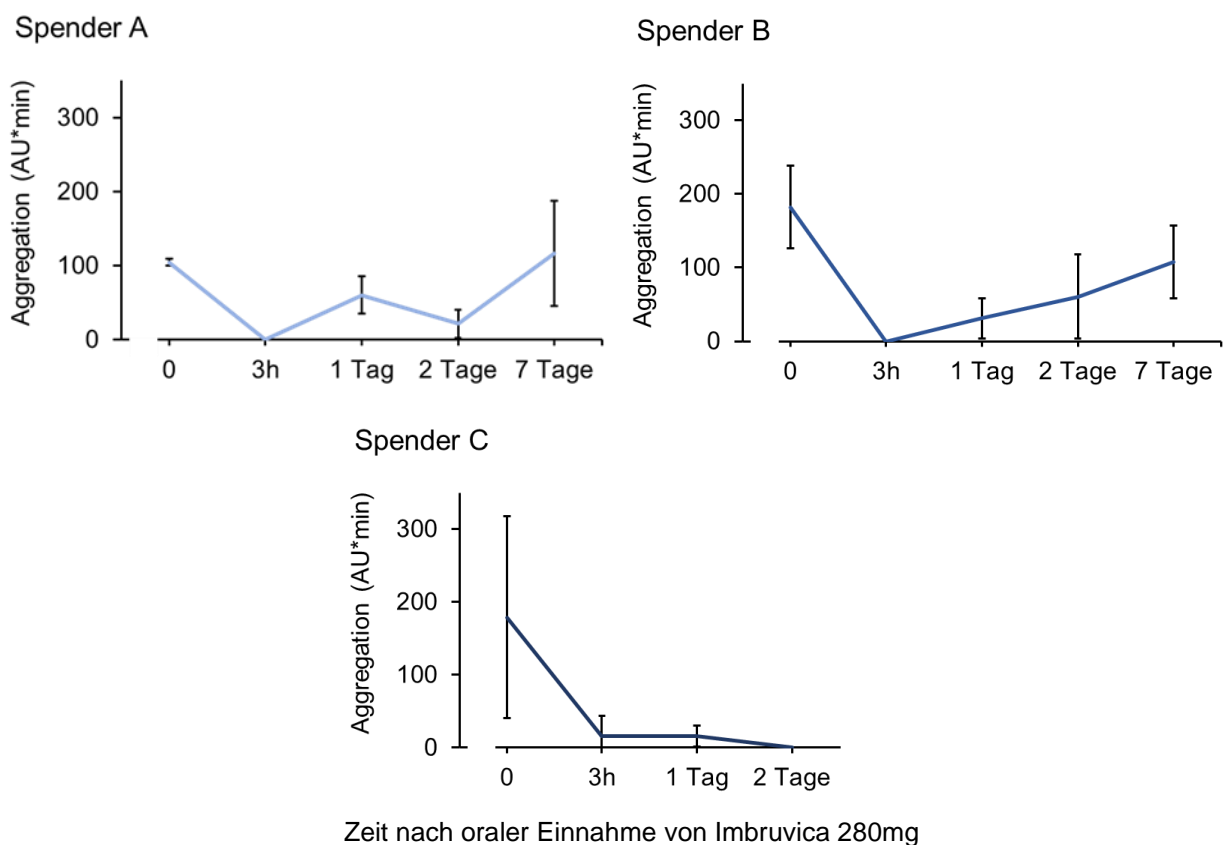


Abb. 33: Wirkung von Imbruvica auf die Spontanaggregation von Thrombozyten. Die SPA wurde bei drei Spendern A, B, C vor, drei Stunden, einen Tag, zwei Tage und eine Woche nach der Einnahme von Imbruvica (280mg) für 10 Minuten gemessen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=3).

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des thrombozytären Fc-Rezeptors durch den Fc-Teil von endogenem IgG im Blut verursacht sein könnte, wurde Blut mit humanen IgG-Antikörpern, die gegen humanen Fc gerichtet sind, für drei Minuten vorinkubiert. War die SPA zuvor erhöht, wurde eine signifikant geringere Aggregation nach Vorinkubation der Proben mit dem Fc-IgG Antikörper beobachtet. Dabei stieg die Hemmung der Aggregation mit der Konzentration des IgG-Antikörpers an. War die SPA jedoch nicht erhöht (unter 200 AU*min) blieb diese durch die Zugabe des IgG-Antikörpers unverändert (**Abb. 34**).

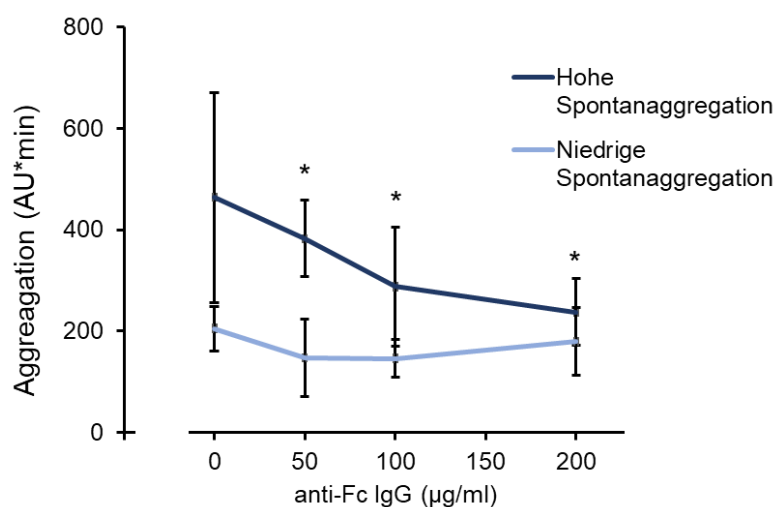


Abb. 34: Wirkung von humanen Fc-IgG Antikörpern auf die SPA von Thrombozyten. Die Blutproben wurden 3 Minuten (ohne Rühren) mit unterschiedlichen Konzentrationen (50, 100 und 200 µg/ml) eines humanen Antikörpers (IgG), welcher gegen den Fc-Teil von humanem IgG gerichtet ist, vorinkubiert, bevor die Messung (10 Minuten) unter Rühren gestartet wurde. Unterschieden wurde zwischen Proben von Spendern mit erhöhter SPA (> 300 AU*min) und niedriger Spontanaggregation (<250 AU*min). Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=4). *P < 0,05 im Vergleich zu den Proben ohne Fc-IgG Antikörper.

Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Spontanaggregation und einer erhöhten Aggregation nach FcγRIIA-Stimulation war nicht feststellbar. So zeigten Probanden mit erhöhter Spontanaggregation keine signifikant höhere Aggregation nach CD32 *cross-linking* oder Aktivierung mit HIT-Serum und Heparin als Probanden mit niedriger Spontanaggregation.

5 Diskussion

5.1 Fc-Rezeptor-induzierte Thrombozytenaktivierung, Btk-Inhibitoren und Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Die durchgeführten Experimente zeigen, unseres Wissens nach zum ersten Mal, dass unterschiedliche Btk-Inhibitoren die über den FcγRIIA ausgelöste Thrombozytenaktivierung im Blut mit niedrigen IC₅₀-Werten hemmten. Diese Hemmung war bei allen getesteten Aktivierungsmöglichkeiten des Rezeptors nachweisbar, sowohl bei der Aktivierung durch CD32 *cross-linking* und den CD9-Antikörper, als auch bei der Aktivierung mit HIT-positivem Serum und Heparin (**Abb. 35**). Die orale Einnahme einer niedrigen Einzeldosis des Btk-Inhibitors Ibrutinib von gesunden Probanden reichte bereits aus, um eine bis zu zwei Tage anhaltende Hemmung der FcγRIIA-vermittelten Thrombozytenaktivierung zu erzielen.

Alle sechs untersuchten Btk-Inhibitoren hemmten komplett die Thrombozytenaggregation und –sekretion, sowie die die P-Selektin-Expression und die Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen.

In der Arbeit wurde der FcγRIIA auf Thrombozyten im Blut zunächst auf zwei Arten aktiviert: Zum einen über CD32 *cross-linking* mit einem primären CD32-Antikörper (dem monoklonalen AT10) und einem sekundären Maus-Antikörper (Fab2), zum anderen mit dem CD9-Antikörper. Bei beiden Aktivierungswegen kam es zur Thrombozytenaggregation, bei CD9-Antikörper-Stimulation war allerdings im Gegensatz zum *cross-linking* keine ATP-Sekretion feststellbar. Da eine Blockierung des FcγRIIA die Thrombozytenaggregation durch den CD9-Antikörper verhinderte, steht außer Frage, dass diese von der FcγRIIA-Aktivierung abhängig ist.

Serum von Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie

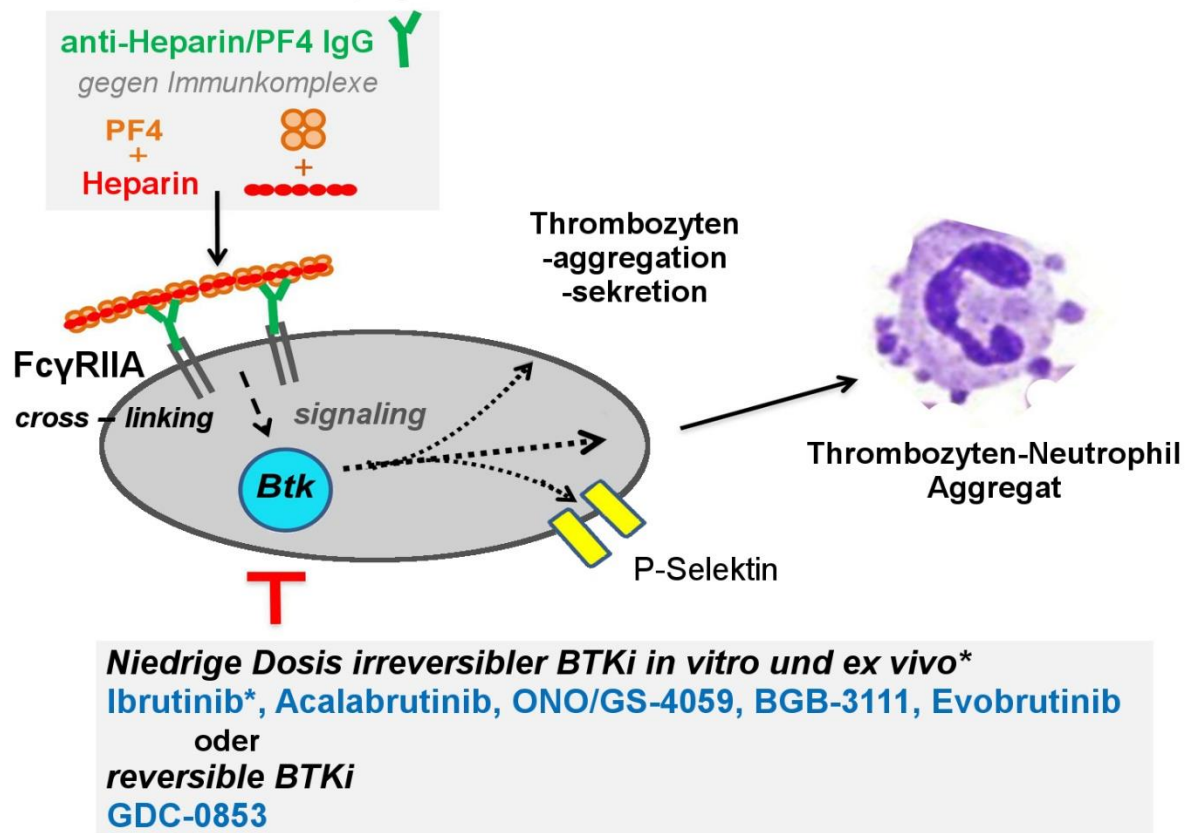


Abb. 35: Beteiligung von Btk im FcγRIIA-Signalweg in Thrombozyten und Hemmung durch Btk-Inhibitoren. Niedrige Konzentration irreversibler (Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) und reversible Btk-Inhibitoren (GDC-0853) hemmen den Btk-Signalweg nach Aktivierung der Thrombozyten durch FcγRIIA *cross-linking*. Die Thrombozytenaggregation, -sekretion, P-Selektin-Expression und die Bildung Thrombozyten-Neutrophil-Komplexe sind somit verringert. PF4: Plättchenfaktor 4, BTKi: Btk-Inhibitoren.

In einer früheren Arbeit an gewaschenen Thrombozyten von Qi et al. wurde gezeigt, dass die FcγRIIA-Aktivierungswege durch CD9 und CD32 *cross-linking* unterschiedlich sind. So waren nach CD9-Antikörper Stimulation die Tyrosinkinasen Lyn und Syk geringer mit FcγRIIA assoziiert als nach *cross-linking*. Ein weiterer Unterschied bestand in der Ca²⁺-Mobilisation. Die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern war bei der CD9-Antikörper Stimulation auf die Freisetzung von TxA₂ und ADP angewiesen, wodurch die Ca²⁺-Freisetzung bei CD9 im Vergleich zum *cross-linking* verzögert auftrat, und somit auch die Thrombozytenaggregation später eintrat. Im Gegensatz dazu induziert das *cross-linking* direkt die Bildung von IP₃ und führt damit zu einer schnelleren Ca²⁺-Freisetzung und schnelleren

Thrombozytenaggregation (Qi et al. 1996). Diese Unterschiede in der Signalübertragung nach FcγRIIA Stimulation könnten die fehlende ATP-Sekretion bei der CD9-Antikörper-Aktivierung im Blut erklären. Auch im Blut war in den eigenen Experimenten die Aggregation nach CD9-Antikörper-Stimulation verzögert und trat, verglichen mit CD32 *cross-linking*, erst ein bis zwei Minuten später auf. Dies liegt möglicherweise an der fehlenden ADP-Sekretion nach CD9-Antikörper Stimulation, welche die Aggregation beschleunigt.

Trotz der Unterschiede zwischen den beiden Stimuli kam es bei beiden zu einer kompletten Hemmung der Thrombozytenaggregation durch die verschiedenen irreversible Btk-Inhibitoren und den einen untersuchten reversiblen Btk-Inhibitor. Dabei zeigten die irreversiblen Btk-Inhibitoren ähnliche IC₅₀-Werte für die Hemmung der CD9- und CD32 *cross-linking* stimulierten Thrombozytenaggregation. Die Wirksamkeit der irreversiblen Btk-Inhibitoren unterschied sich jedoch untereinander und zeigte mit aufsteigender IC₅₀ folgende Reihenfolge: Ibrutinib > BGB-3111 > Acalabrutinib > ONO/GS4059 > Evobrutinib. Die IC₅₀ Werte für die Hemmung der FcγRIIA-induzierten Aggregation entsprachen dabei in etwa den IC₅₀ Werten für die Hemmung der Aggregation nach Stimulierung mit niedrigen Kollagenkonzentrationen (Denzinger et al. 2019). Hervorzuheben ist, dass der wirksamste Hemmer der reversible Btk-Inhibitor GDC-0853 (IC₅₀=11nM) war, welcher bisher nicht in Thrombozyten untersucht wurde (**Abb. 35**).

Die Aktivierung von Btk nach FcγRIIA-Stimulierung auf Thrombozyten wurde zum ersten Mal von Oda et al. vor 20 Jahren beschrieben. Die Btk-Aktivierung war hierbei, ähnlich der Btk-Aktivierung nach Kollagen-vermittelter GPVI-Aktivierung, abhängig von verschiedenen Signalwegen, darunter Src-Kinasen und PI3-Kinasen (Oda et al. 2000). Die Rolle von Btk für die Thrombozytenaktivierung nach FcγRIIA-Stimulation wurde bisher jedoch nicht untersucht. In einer nicht publizierten Versuchsreihe von Professor Wolfgang Siess wurde beobachtet, dass die Aggregation isolierter (gewaschener) Thrombozyten von XLA-Patienten nach FcγRIIA-Stimulation stark reduziert war, was auf eine Beteiligung von Btk hinwies. Die vorliegenden Ergebnisse der Versuche mit Btk-Inhibitoren legen nahe, dass die Thrombozytenaggregation und -sekretion aus den dichten und α-Granula nach FcγRIIA-Stimulation im Blut von der Btk-Aktivierung abhängig sind.

Die FcγRIIA-Stimulation aktiviert in Thrombozyten außer Btk auch die strukturell ähnliche Kinase Tec (Oda et al. 2000). Die Funktion dieser Kinase für die thrombozytäre FcγRIIA-Stimulation ist unbekannt. Tec spielt eine wichtige Rolle bei der GPVI-Stimulation durch Kollagen und ist in der Lage, das funktionelle Btk-Defizit bei XLA Patienten zu kompensieren, was möglicherweise erklärt, warum es bei diesen Patienten nicht zu Blutungen kommt (Atkinson et al. 2003; Oda et al. 2000; Busygina et al. 2019). Entsprechend den Ergebnissen dieser Dissertation ist es aus folgenden Gründen wahrscheinlich, dass Btk und nicht Tec die FcγRIIA-stimulierte Thrombozytenaktivierung vermittelt: (a) Alle getesteten Btk-Inhibitoren hemmten die maximale Thrombozytenaggregation komplett, egal ob nach FcγRIIA-*cross-linking*, CD9- oder HIT-Serum-Stimulation. Dies steht im Gegensatz zur GPIV-vermittelten Thrombozytenaktivierung, bei der durch eine Erhöhung der Kollagen- oder CRP-Konzentrationen die Btk-Inhibitor-induzierte Hemmung durch den alternativen Tec-Signalweg aufgehoben wird (Busygina et al. 2019; Denzinger et al. 2019; Nicolson et al. 2018). (b) Die Hemmung der FcγRIIA-stimulierten Thrombozytenaggregation im Blut trat schon bei niedrigen, Btk-spezifischen Konzentrationen irreversibler Btk-Inhibitoren auf (Bye et al. 2015; Nicolson et al. 2018). Die IC₅₀-Werte von Ibrutinib (0,08μM) und Acalabrutinib (0,38μM) für die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch CD32 *cross-linking* waren sogar deutlich niedriger als die Plasmakonzentrationen bei Therapie von B-Zell-Erkrankungen (jeweils 0,31μM und 1,78μM), die benötigt wird um Btk in peripheren mononuklearen Blutzellen komplett zu hemmen (Byrd et al. 2015b; Chen et al. 2018; Advani et al. 2013). (c) GDC-0853, welcher zur Gruppe der reversiblen Btk-Inhibitoren gehört, die Tec in Kinase Assays nicht hemmen (Crawford et al. 2018), hemmte die thrombozytäre FcγRIIA-Aktivierung im Blut mit einer sehr geringen IC₅₀ (11nM). Dieser Wert ist identisch zu dem IC₅₀ Wert für GDC-0853 für die Hemmung der Btk-Autophosphorylierung in Blut (Crawford et al. 2018). Zusammengefasst scheint im Gegensatz zum GPVI-Signalweg (Atkinson et al. 2003; Busygina et al. 2019), Btk, aber nicht Tec, für die Thrombozytenaktivierung nach FcγRIIA-Stimulation im Blut verantwortlich zu sein.

In vitro könnte eine Verlängerung der Vorinkubationszeit der Btk-Inhibitoren im Blut besser die *in vivo* Situation der Thrombozyten nach einer oralen Einnahme des Medikaments und die damit einhergehende verlängerte Absorptionsphase

wiedergeben. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass eine verlängerte Vorinkubationszeit die Wirksamkeit der irreversiblen Btk-Inhibitoren im Hinblick auf die Hemmung der FcγRIIA-vermittelten Thrombozytenaktivierung steigert. Dies stimmt mit den Beobachtungen für die Hemmung der GPVI-vermittelten Thrombozytenaggregation überein (Denzinger et al. 2019). Der reversible Btk-Inhibitor GDC-0853 zeigte diese kinetischen Eigenschaften nicht und unterscheidet sich daher pharmakodynamisch von irreversiblen Btk-Inhibitoren. Irreversible Btk-Inhibitoren könnten aufgrund ihrer kovalenten Bindung an Cys-481 mehr Zeit als reversible Btk-Inhibitoren benötigen, um die im Zytosol vorkommende Btk zu erreichen beziehungsweise zu inaktivieren.

Es ist bekannt, dass auf HIT-Antikörper positiv getestete Patientenseren in Kombination mit niedrigen Dosen Heparin (0,5-1 U/ml) eine Thrombozytenaggregation im Blut, gemessen mit MEA, induzieren können (Morel-Kopp et al. 2016). Auch in dieser Arbeit induzierten gelagerte, eingefrorene Seren von HIT-Patienten mit positiven IgG-Antikörper Titern gegen PF4-Heparin in der Gegenwart von niedrig dosiertem Heparin eine mit dem MEA messbare Thrombozytenaggregation in Hirudin-antikoagulierte Blut gesunder Probanden. Allerdings ist nur ein Teil der im Rahmen einer HIT generierten Heparin/PF4-IgG-Antikörper in der Lage durch *cross-linking* des thrombozytären Fc-Rezeptor die Thrombozyten zu aktivieren. Bei Testung mit ausgewählten Thrombozytenspendern, die in ersten Versuchen die höchste Reaktivität auf HIT-Seren gezeigt hatten, war im Multiplate® bei 7 der 28 untersuchten Patientenseren (=25%) mit positiven PF4-Heparin-IgG Titern eine Thrombozytenaggregation nachweisbar. Dies ist niedriger als in vorausgegangen Studien, welche in MEA-Versuchen mit HIT-Seren, die gegen Heparin/PF4 gerichtete IgG-Antikörper enthielten, unterschiedlich hohe positive Ergebnisse für die Thrombozytenaktivierung (in % von n untersuchten HIT-Seren) berichteten: 42,5% von 181 HIT-Patienten (Morel-Kopp et al. 2012), 60% von 30 HIT-Patienten (Galea et al. 2013), 35% von 37 HIT-Patienten (Jin et al. 2019) und 52% von 20 HIT-Patienten (Favaloro et al. 2018) (Emmanuel J. Favaloro, Westmead Hospital, Korrespondenz mit Prof. W. Siess am 8 Oktober 2019). Diese Unterschiede lassen sich zum Teil durch die Art der HIT-Seren-Testung im MEA erklären, sowie die Verfügbarkeit reaktiver Spenderthrombozyten. In meiner Arbeit zeigten sich zwischen den gesunden Probanden deutliche Unterschiede in ihrer Reaktivität auf

das HIT-Serum: Von den 10 untersuchten gesunden Spendern haben nur 5 auf die Stimulation mit demselben HIT-Serum mit einer deutlichen Thrombozytenaggregation reagiert, obwohl CD32 *cross-linking* und CD9-Antikörper Stimulation bei allen Spendern eine maximale Aggregation auslöste.

Ein wichtiger Faktor für die Reaktivität der Thrombozyten auf HIT-Serum sind funktionell relevante Polymorphismen des Fc-Rezeptors (Qiao et al. 2015; Warmerdam et al. 1990). Es scheint, dass der Arg/Arg-131-Genotyp des Rezeptors den Thrombozyten eine höhere Sensitivität auf verschiedene Stimuli verleiht (Clancy et al. 2019) und dass Spender mit diesem Genotyp häufiger auf HIT-Seren reagieren als Spender mit den Genotypen Arg/His-132 und His/His-131 (Morel-Kopp et al. 2012; Slavik et al. 2015). Dieser und weitere Fc-Rezeptor-Polymorphismen (Qiao et al. 2015) könnten der Grund für die variierende Reaktion der Probanden-Thrombozyten auf das HIT-Serum sein (Morel-Kopp et al. 2016).

Es ist hervorzuheben, dass die irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib und Acalabrutinib, sowie der reversible Btk-Inhibitor GDC-0853 die Aggregation um bis zu 95% gehemmt haben, und zwar unabhängig von der jeweiligen Kombination von HIT-Seren mit den Spender-Thrombozyten und der Höhe der Aggregation (**Tabelle 3**). Die dabei verwendeten Konzentrationen von Ibrutinib (0,2µM) und Acalabrutinib (1µM) lagen dabei unter den therapeutischen Plasmakonzentrationen bei Patienten mit B-Zell-Erkrankungen (Byrd et al. 2015b; Chen et al. 2018; Advani et al. 2013).

Die Btk-Inhibitoren hemmten auch die FcγRIIA-vermittelte P-Selektin-Expression auf Thrombozyten, welche deren Interaktion mit Endothelzellen und Monozyten vermittelt (Thomas und Storey 2015). Die Bindung an Monozyten erhöht die monozytäre TF-Expression und fördert damit die Bildung von Thrombin (Celi et al. 1994), ein zentraler Faktor der HIT (Greinacher 2015a; Arepally 2017). Die Inhibitoren hemmten außerdem die Bildung von FcγRIIA-stimulierten Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen. Die von diesen Komplexen induzierte Aktivierung von Endothelzellen, die zur Bildung von Thrombosen beitragen, ist somit gehemmt (Lisman 2018; Rollin et al. 2016) (**Abb. 35**).

Unsere Ergebnisse weisen auf einen möglichen Nutzen von Btk-Inhibitoren in der Therapie von HIT hin. In der Behandlung von B-Zellerkrankungen mit hohen Dosen der irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib und Acalabrutinib werden Blutungen von Grad 1 und 2 zwar häufig (40-50%) beobachtet (IMBRUVICA 2018; CALQUENCE 2017; Busygina et al. 2019), deren zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch höchst komplex, wobei die Blutungsneigung nur zum Teil auf die direkte Thrombozytenhemmung zurückzuführen ist (Busygina et al. 2019; Shatzel et al. 2017). Bei XLA-Patienten, die ein genetisch bedingtes Defizit an Btk haben, treten dagegen keine Blutungen auf, vermutlich weil Tec ihre Aufgabe bis zu einem gewissen Grad übernimmt (Busygina et al. 2019; Oda et al. 2000; Atkinson et al. 2003; Quek et al. 1998). Es ist wahrscheinlich, dass niedrige Dosierungen der irreversiblen Btk-Inhibitoren in Thrombozyten präferentiell Btk und weniger Tec hemmen und somit kaum zu Blutungen führen. Tatsächlich wurde gefunden, dass, ähnlich den Btk-defizienten Thrombozyten von XLA- Patienten und XID-Mäusen (Quek et al. 1998; Atkinson et al. 2003; Liu et al. 2006), irreversible Btk-Inhibitoren in niedrigen Konzentrationen nur die gering-gradige Kollagen/GPVI-vermittelte Thrombozytenstimulation und die vWF/GPIb vermittelte Thrombozytenaggregation durch Ristocetin hemmten (Busygina et al. 2018; Busygina et al. 2019; Denzinger et al. 2019). Die *in vitro* Blutungszeit, gemessen mit dem PFA-200®, war jedoch unverändert (Denzinger et al. 2019). Da reversible Btk-Inhibitoren auch bei hohen Konzentration Tec nicht hemmen (Crawford et al. 2018) könnten Blutungen bei der Behandlung mit diesen Inhibitoren ausbleiben (s.u.).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine einzelne, oral verabreichte Dosis Ibrutinib (280 mg) die vWF/GPIb-vermittelte, und die geringgradige GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation nach Plaque-Stimulation bis zu 24 Stunden nach Ibrutinib-Einnahme hemmte. Die hochgradige GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit hohen Kollagen-Konzentrationen und die GPCR-vermittelte Thrombozytenaggregation stimuliert durch ADP, TRAP und Arachidonsäure waren nicht gehemmt, was die Ergebnisse einer früheren Studie mit niedrig dosiertem Ibrutinib (140 mg/Tag) über den Zeitraum einer Woche bestätigte (Busygina et al. 2018). Diese einzelne Dosis Ibrutinib reichte dagegen bereits aus, um die FcγRIIA-vermittelte Thrombozytenaggregation im Blut schnell und suffizient zu hemmen. Bei zwei der drei untersuchten Probanden hielt diese Hemmung über einen Zeitraum von

zwei Tagen an, was auf die irreversible Hemmung durch die kovalente Bindung an Btk und deren fehlende Neubildung in den kernlosen Thrombozyten zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu ist die Btk-Hemmung nach einmaliger Ibrutinib-Applikation in milzständigen Lymphozyten bereits nach einem Tag wieder aufgehoben (Chang et al. 2011). Die Erholung der FcγRIIA-vermittelten Thrombozytenaggregation, welche nach sieben Tagen wieder zu den Ausgangswerten zurückkehrte, entsprach in etwa der Regenerierungsrate der Thrombozyten. Die ATP-Sekretion aus den dichten Granula nach CD32 *cross-linking* war überraschenderweise nach sieben Tagen noch deutlich beeinträchtigt.

Die stärkere Hemmung der Thrombozyten nach der Ibrutinib Einnahme bei den Probanden A und C im Vergleich zu Proband B ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Bioverfügbarkeit des Ibrutinib deutlich verbessert wird, wenn es mit Essen zu sich genommen wird (Jong et al. 2015; Vries et al. 2016), was Proband B nicht getan hat. Ibrutinib wird vor allem durch das Enzym Cytochrom P450 3A im Dünndarm und in der Leber abgebaut; bei Einnahme mit Essen entgehen 47% dieser Inaktivierung (Jong et al. 2015; Vries et al. 2016)

Reversible Btk-Inhibitoren könnten in der Behandlung einer HIT im Vergleich zu irreversiblen Btk-Inhibitoren eine größere Sicherheit aufweisen, weil Nebenwirkungen nach deren Absetzen rasch abklingen werden. Auch ist es wahrscheinlich, dass reversible Btk-Inhibitoren keine Blutungen auslösen, weil sie *in vitro* Kinase Assays auch in hohen Konzentrationen die Tyrosinkinase Tec nicht hemmen (Crawford et al. 2018; Chen et al. 2018; Katewa et al. 2017). Damit in Einklang wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der reversible Btk-Inhibitor GCD-0853 sogar in 20-fach höherer Konzentration, als für die maximale Hemmung der FcγRIIA-vermittelten Thrombozytenaktivierung benötigt wurde, die *in vitro* Blutungszeit, gemessen mit dem PFA-200®, nicht erhöht. GDC-0853 hemmte außerdem die Thrombozytenaggregation nach niedriger, nicht aber nach hochdosierter Kollagenstimulation sowie die die vWF/GPIIb-vermittelte Thrombozytenaggregation nach Ristocetin-Stimulation. Diese Ergebnisse mit GCD-0853 ähneln dem Thrombozytenphänotyp Btk-defizienter XLA-Patienten und XID-Mäusen. Weiterhin wurden in einer Phase I Studie auch nach oraler Einnahme ansteigender Dosierungen von GDC-0853 keine Blutungen bei den Probanden festgestellt. Entsprechend meinen Ergebnissen reichte eine Konzentration von 50nM GDC-0853 im Blut bereits aus, um die FcγRIIA-Stimulation

nach CD32 *cross-linking* und HIT-Serum komplett zu hemmen. Der Inhibitor zeigte dabei einen sehr niedrigen IC₅₀ Wert (11nM), was mit dem IC₅₀ von GDC-0853 für die Hemmung der Btk-Autophosphorylierung im Blut übereinstimmt (11nM) (Crawford et al. 2018). Eine niedrige Dosis oral verabreichten GDC-0853 sollte daher in der Lage sein, den thrombozytären Fc-Rezeptor-Signalweg effizient zu hemmen und die Thrombozytenaktivierung bei HIT zu verringern.

5.2 Fc-Rezeptor vermittelte thrombozytäre Spontanaggregation im Blut

Erstmals wurde hier eine 2. Form der SPA im Blut gemessen mit MEA beschrieben, und deren Mechanismus identifiziert. Diese SPA begann nach drei bis vier Minuten und war nach 10 Minuten deutlich messbar. Sie ist von der 1. Form der SPA abzugrenzen, welche ADP-abhängig ist, in den ersten Minuten beginnt und nur beobachtet wird, wenn das Blut in der dreiminütigen Vorinkubations- und Aufwärmzeitzeit gerührt wird (Bampalis et al. 2012). Die Ergebnisse zeigen, dass die 2. Form der SPA abhängig von der FcγRIIA Aktivierung ist. Zum einen führte eine Blockierung des Rezeptors durch Vorinkubation mit einem CD32-Antikörper zu einer deutlichen Reduzierung der SPA. Weiterhin führte die Hemmung des FcγRIIA-Signalwegs durch die Btk-Inhibitoren GDC-0853 (*in vitro*) und Ibrutinib (*ex vivo*) ebenfalls zur Blockierung der SPA. Auch die Vorinkubation mit einem humanen IgG-Antikörper, der gegen den humanen Fc-Teil gerichtet ist, führte zu einer Verringerung der erhöhten SPA.

Es bleibt die Frage, was den FcγRIIA im Blut gesunder Probanden spontan aktiviert und dadurch eine erhöhte SPA herbeiführt. Es wurde beobachtet, dass nur einige der gesunden Probanden eine erhöhte SPA aufweisen, also interindividuelle Unterschiede vorliegen müssen. Zwar schwankte das Ausmaß der SPA bei allen getesteten Probanden zwischen den Messtagen, aber sie lag konstant entweder im Rahmen einer erhöhten oder einer normalen SPA. Einen Grund für diese interindividuellen Unterschiede könnten die oben bereits beschriebenen Polymorphismen des Fc-Rezeptors darstellen (Qiao et al. 2015; Warmerdam et al. 1990). Spender mit dem Genotyp Arg/Arg-131-Genotyp reagieren sensibler auf verschiedene Stimuli (Clancy et al. 2019), möglicherweise sind es auch diese Spender, die eine erhöhte SPA aufweisen. Generell kann der Fc-Rezeptor durch viele verschiedene körpereigene, Agonisten aktiviert werden. Prinzipiell können IgG-Immunkomplexe, IgG-Aggregate, und IgG-opsonierte Bakterien (Arman und Krauel

2015) mit ihrem Fc-Teil an FcγRIIA binden, und durch *cross-linking* den Rezeptor aktivieren. Dies können auch anti-thrombozytäre Antikörper (wie beispielsweise gegen GPVI-gerichtete IgGs, oder, wie in der Arbeit gezeigt, der CD9-Antikörper) bewerkstelligen, welche mit ihrem Fv-Teil an spezifische Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche binden und mit ihrem Fc-Teil an FcγRIIA.

Weiterhin kann der Rheumafaktor (RF), welcher ein gegen den Fc-Teil von IgG gerichteter Autoantikörper verschiedener Ig-Subklassen darstellt, durch die Bildung von Immunkomplexen Fc-Rezeptoren aktivieren (Ingegnoli et al. 2013; Ben Mkaddem et al. 2019). Der RF der IgM- und IgA-Subklasse ist nicht nur der bekannteste diagnostische Marker der Rheumatischen Arthritis, sondern wird auch bei Patienten mit anderen rheumatischen und infektiösen Erkrankungen, und sogar bei bis zu 5% der Gesunden gefunden (Feist et al. 2007; Schneider et al. 2019; Ingegnoli et al. 2013). Es gibt auch RFs der IgG-Subklasse, welche an den Fc-Teil von IgG1, IgG2, IgG4 binden, nicht aber an IgG3. Hoch spezifische und potente Btk-Inhibitoren zeigten in vorklinischen Studien gute Ergebnisse in der Behandlung von RA (Gillooly et al. 2017). Die Hemmung einer erhöhten SPA nach Vorinkubation des Blutes mit einem humanem, gegen den Fc-Teil von IgG gerichteten Antikörper unterstützt die Hypothese, dass der RF involviert sein könnte, weil er die Anlagerung des RF verhindern würde.

Da die Thrombozytenaktivierung und Aggregation mit daraus resultierenden arteriellen Thrombosen der zentrale Bestandteil in der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms und anderer kardiovaskulären Erkrankungen sind, könnte die Untersuchung der SPA nützlich sein, um diese Prozesse besser zu verstehen. Die FcγRIIA-vermittelte erhöhte SPA könnte einen möglichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen.

6 Klinische Relevanz

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, dass reversible oder niedrig dosierte irreversible Btk-Inhibitoren eine neue Möglichkeit zur Hemmung der FcγRIIA-vermittelten Thrombozytenaktivierung darstellen. In klinischen Studien könnten sie dazu genutzt werden, der Entstehung einer HIT bereits in einer frühen Stufe entgegenzuwirken und damit an einem Punkt ansetzen, der therapeutisch bisher nicht in Angriff genommen wird.

Neben der Hemmung der FcγRIIA-vermittelten Thrombozytenaggregation und Sekretion von Granula-Inhaltstoffen (wie prothrombotischen Koagulationsfaktoren und entzündlichen Zytokinen) bewirken Btk-Inhibitoren außerdem eine Hemmung der FcγRIIA-induzierten thrombozytären P-Selektin-Expression und damit der Interaktion der Thrombozyten mit Monozyten und Endothelzellen, was die Bildung von Thrombosen und Entzündungen bei HIT reduziert. Auch die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung der Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen, welche über die Bildung von NETs zur Thrombusbildung beitragen (Gollomp et al. 2018; Perdomo et al. 2019), sollte sich günstig auf die Entwicklung des Krankheitsbildes auswirken. Aufgrund der fehlenden Neubildung von Btk in Thrombozyten und der kovalenten Bindung der irreversiblen Btk-Inhibitoren, reichen hier schon niedrige Konzentrationen aus, um die Btk-Aktivierung in Thrombozyten selektiv zu hemmen, ein ähnliches Prinzip wie die Einnahme von Aspirin in niedriger Dosierung (Lorenz et al. 1981). Da die irreversiblen Btk-Inhibitoren bei niedriger Dosierung die Btk-ähnliche Tyrosinkinase Tec nicht oder nur gering hemmen sollten, sollte auch nicht die Gefahr von Blutungen zu erwarten sein. Eine Alternative bieten die reversiblen Btk-Inhibitoren, die, weil reversibel, sicherer und einfacher zu dosieren sind, und wahrscheinlich auch bei hoher Dosierung keine Blutungen auslösen. Der hochwirksame reversible Btk-Inhibitor GDC-0853 erreicht beispielsweise bei einer täglich eingenommenen Einzeldosis 1-3 Stunden nach Einnahme seine maximale Plasmakonzentration, und hat auch weitere gute pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften (Herman et al. 2018). Reversible Btk-Inhibitoren blockieren dazu nicht nur die FcγRIIA-Aktivierung von Thrombozyten, wie in dieser Arbeit gezeigt, sondern auch die Aktivierung von B-Lymphozyten und Monozyten (Crawford et al. 2018) und eventuell auch von neutrophilen Granulozyten (Herter et al. 2018; Fiedler et al. 2011). Sie dürften somit thrombozytenunabhängig die initiale HIT-Antikörperbildung reduzieren, sowie die monozytäre TF-Expression

und die granulozytäre NET-Bildung hemmen und damit zur Hemmung der Thrombusbildung bei HIT beitragen.

Um herauszufinden, ob reversible oder irreversible Btk-Inhibitoren für die Behandlung einer HIT besser geeignet sein könnten, wären zunächst Untersuchungen an einem *in vivo* Maus Modell geeignet (Reilly et al. 2001). In transgenen Mäusen, die sowohl den humanen Thrombozyten-FcγRIIA als auch den humanen PF4 exprimieren, wurde bereits ein Syk-Hemmer als Behandlungsmöglichkeit für HIT getestet (Reilly et al. 2011). In diesem Modell könnten zusätzlich auch die Effekte von Btk-Inhibitoren auf die Neutrophil-Aktivierung bei einer HIT untersucht werden (Herter et al. 2018; Fiedler et al. 2011). Aktuelle Berichte einer FcγRIIA-Aktivierung von Neutrophilen, von Neutrophilen-Thrombozyten-Interaktionen und NET-Bildung bei HIT rücken Neutrophilen-vermittelte Mechanismen ins Zentrum der Pathophysiologie dieser Erkrankung, welche wahrscheinlich durch Btk-Inhibitoren hemmbar sind (Perdomo et al. 2019; Gollomp et al. 2018).

7 Zusammenfassung

Der gefährlichste Aspekt einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie vom Typ II (HIT) ist die Bildung von Thrombosen. Diese sind für die hohe Letalität dieser Krankheit verantwortlich und bislang noch nicht ausreichend therapierbar.

Ein früher Schritt und zentraler Bestandteil der HIT-Pathogenese ist die Aktivierung des thrombozytären Fc-Rezeptor (FcγRIIA, CD32a) durch Heparin-PF4-IgG Immunkomplexe (**Abb. 35**), welcher bisher in der Therapie noch nicht berücksichtigt wird. Eine Komponente des FcγRIIA Signalwegs in Thrombozyten ist die Aktivierung der Brutons Tyrosinkinase (Btk), ihre Bedeutung für die Fc-Rezeptor stimulierte Thrombozytenaktivierung war bisher jedoch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob die FcγRIIA-vermittelte Thrombozytenaggregation durch Btk-Inhibitoren gehemmt werden kann. Getestet wurden sowohl die für die Behandlung von B-Zellerkrankungen zugelassenen irreversiblen Btk-Inhibitoren Ibrutinib und Acalabrutinib und die sich noch klinischen Studien für die Behandlung von B-Zellerkrankungen befindenden Btk-Inhibitoren BGB-3111 (Zanubrutinib) und ONO/GS-4059 (Tirabrutinib). Weiterhin wurden der irreversible Btk-Inhibitor Evobrutinib (in klinischen Studien zur Behandlung der Multiplen Sklerose) und der reversible Btk-Inhibitor GDC-0853 (Fenebrutinib, in klinischen Studien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen) getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle getesteten Btk-Inhibitoren die Thrombozytenaktivierung nach FcγRIIA-Stimulation durch Antikörper *cross-linking*, CD9-Antikörper und HIT-Serum hemmten. Die Konzentrationen bei denen die Btk-Inhibitoren 50% (IC₅₀) der FcγRIIA *cross-linking* induzierten Thrombozytenaggregation hemmten, lagen für die irreversiblen Btk-Inhibitoren bei 0,08μM (Ibrutinib), 0,11μM (BGB-3111), 0,38μM (Acalabrutinib), 0,42μM (ONO/GS-4059) und 1,13μM (Evobrutinib) und für den reversiblen Btk-Inhibitor GDC-0853 bei 0,011μM. Die IC₅₀ Werte waren für Ibrutinib und Acalabrutinib damit vier- bis fünfmal niedriger als die Plasmakonzentrationen bei Patienten, die diese Btk-Inhibitoren zur Behandlung von B-Zellerkrankungen erhalten. Außerdem supprimierten die Btk-Inhibitoren die ATP-Sekretion der Thrombozyten, deren P-Selektin-Expression und die Bildung von Thrombozyten-Neutrophil-Komplexen nach FcγRIIA *cross-linking*. Die P-Selektin-vermittelte Interaktion von Thrombozyten und Neutrophilen führt zur Ausbildung von NETs, die verschiedene prothrombotische Moleküle enthalten wie TF, vWF und

Fibrinogen und somit zur Bildung von Thromben beitragen (Perdomo et al. 2019). P-Selektin aktivierter Thrombozyten interagiert außerdem mit dem PSGL-1-Rezeptor auf Monozyten und regt diese zur TF-Synthese und Thrombinbildung an (Pouplard et al. 2001). Durch die Hemmung der P-Selektin-Expression ist das Risiko einer Thrombusbildung also deutlich herabgesetzt. Die Einnahme einer einzigen oralen Dosis Ibrutinib (280 mg) reichte bereits aus, um eine schnelle und anhaltende Hemmung der Thrombozyten-FcγRIIA-Aktivierung zu erreichen.

In weiteren Studien könnte untersucht werden, ob es sinnvoller ist, niedrig dosierte irreversible oder reversible Btk-Inhibitoren klinisch einzusetzen. Reversible Btk-Inhibitoren haben den Vorteil, dass sie (weil reversibel) sicherer sind und, wie hier *in vitro* gezeigt, wahrscheinlich nicht zu Blutungen führen. Zudem inhibieren sie möglicherweise zusätzlich die initiale HIT-Antikörperbildung durch Suppression der B-Lymphozyten, sowie die monozytäre TF-Expression und die NET-Bildung, wodurch sie die Hemmung der Thrombusbildung bei HIT verstärken würden.

Ob Btk-Inhibitoren dazu genutzt werden können, HIT zu behandeln, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

- Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. (2017): Flow cytometry: basic principles and applications. In: *Critical reviews in biotechnology* 37 (2), S. 163–176. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876.
- Advani, R. H.; Buggy, J. J.; Sharman, J. P.; Smith, S. M.; Boyd, T. E.; Grant, B. et al. (2013): Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (1), S. 88–94. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.7906.
- Amiral, J.; Bridey, F.; Wolf, M.; Boyer-Neumann, C.; Fressinaud, E.; Vissac, A. M. et al. (1995): Antibodies to Macromolecular Platelet Factor 4-Heparin Complexes in Heparin-induced Thrombocytopenia: a Study of 44 Cases. In: *Thrombosis and haemostasis* 73 (01), S. 21–28. DOI: 10.1055/s-0038-1651670.
- Amsel (2019): Phase-2-Daten zu Evobrutinib. Online verfügbar unter <https://www.amsel.de/multiple-sklerose-news/medizin/phase-2-daten-zu-evobrutinib/>, zuletzt geprüft am 30.08.2019.
- Andersen, H.; Greenberg, D. L.; Fujikawa, K.; Xu, W.; Chung, D. W.; Davie, E. W. (1999): Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20), S. 11189–11193. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11189.
- Arepally, G.; Reynolds, C.; Tomaski, A.; Amiral, J.; Jawad, A.; Poncz, M.; Cines, D. B. (1995): Comparison of PF4/heparin ELISA assay with the ¹⁴C-serotonin release assay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. In: *American journal of clinical pathology* 104 (6), S. 648–654. DOI: 10.1093/ajcp/104.6.648.
- Arepally, G. M. (2017): Heparin-induced thrombocytopenia. In: *Blood* 129 (21), S. 2864–2872. DOI: 10.1182/blood-2016-11-709873.
- Arman, M.; Krauel, K. (2015): Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 13 (6), S. 893–908. DOI: 10.1111/jth.12905.
- Atkinson, B. T.; Ellmeier, W.; Watson, S. P. (2003): Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. In: *Blood* 102 (10), S. 3592–3599. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1142.
- Bampalis, V. G.; Brantl, S. A.; Siess, W. (2012): Why and how to eliminate spontaneous platelet aggregation in blood measured by multiple electrode aggregometry. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 10 (8), S. 1710–1714. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04819.x.
- Barf, T.; Covey, T.; Izumi, R.; van de Kar, B.; Gulrajani, M.; van Lith, B. et al. (2017): Acalabrutinib (ACP-196): A Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor with a Differentiated Selectivity and In Vivo Potency Profile. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 363 (2), S. 240–252. DOI: 10.1124/jpet.117.242909.

- Beck, F.; Geiger, J.; Gambaryan, S.; Solari, F. A.; Dell'Aica, M.; Lorocho, S. et al. (2017): Temporal quantitative phosphoproteomics of ADP stimulation reveals novel central nodes in platelet activation and inhibition. In: *Blood* 129 (2), e1-e12. DOI: 10.1182/blood-2016-05-714048.
- Ben Mkaddem, S.; Benhamou, M.; Monteiro, R. C. (2019): Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 811. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00811.
- Berlacher, M. D.; Vieth, J. A.; Heflin, B. C.; Gay, S. R.; Antczak, A. J.; Tasma, B. E. et al. (2013): FcγRIIa ligation induces platelet hypersensitivity to thrombotic stimuli. In: *The American journal of pathology* 182 (1), S. 244–254. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.09.005.
- Bobe, R.; Wilde, J. I.; Maschberger, P.; Venkateswarlu, K.; Cullen, P. J.; Siess, W.; Watson, S. P. (2001): Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of phospholipase Cγ2 in mouse megakaryocytes is independent of Bruton tyrosine kinase translocation. In: *Blood* 97 (3), S. 678–684. DOI: 10.1182/blood.v97.3.678.
- Bottoni, A.; Rizzotto, L.; Lai, T.; Liu, C.; Smith, L. L.; Mantel, R. et al. (2016): Targeting BTK through microRNA in chronic lymphocytic leukemia. In: *Blood* 128 (26), S. 3101–3112. DOI: 10.1182/blood-2016-07-727750.
- Breiddin, H. (1999): Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusions in healthy volunteers? Results of the HAPARG Study. In: *Atherosclerosis* 144 (1), S. 211–219. DOI: 10.1016/S0021-9150(99)00056-8.
- Brown, J. R.; Moslehi, J.; Ewer, M. S.; O'Brien, S. M.; Ghia, P.; Cymbalista, F. et al. (2019): Incidence of and risk factors for major haemorrhage in patients treated with ibrutinib: An integrated analysis. In: *British journal of haematology* 184 (4), S. 558–569. DOI: 10.1111/bjh.15690.
- Brühl, M. von; Stark, K.; Steinhart, A.; Chandraratne, S.; Konrad, I.; Lorenz, M. et al. (2012): Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (4), S. 819–835. DOI: 10.1084/jem.20112322.
- Bruhns, P.; Iannascoli, B.; England, P.; Mancardi, D. A.; Fernandez, N.; Jorieux, S.; Daëron, M. (2009): Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. In: *Blood* 113 (16), S. 3716–3725. DOI: 10.1182/blood-2008-09-179754.
- Bruton, O. C. (1952): Agammaglobulinemia. In: *Pediatrics* 9 (6), S. 722–728.
- Burger, J. A.; Tedeschi, A.; Barr, P. M.; Robak, T.; Owen, C.; Ghia, P. et al. (2015): Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 373 (25), S. 2425–2437. DOI: 10.1056/NEJMoa1509388.
- Busygina, K.; Denzinger, V.; Bernlochner, I.; Weber, C.; Lorenz, R.; Siess, W. (2019): Btk Inhibitors as First Oral Atherothrombosis-Selective Antiplatelet Drugs? In: *Thrombosis and haemostasis*. DOI: 10.1055/s-0039-1687877.

- Busygina, K.; Jamasbi, J.; Seiler, T.; Deckmyn, H.; Weber, C.; Brandl, R. et al. (2018): Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation in humans. In: *Blood* 131 (24), S. 2605–2616. DOI: 10.1182/blood-2017-09-808808.
- Bye, A. P.; Gibbins, J. M. (2018): Move along, nothing to see here: Btk inhibitors stop platelets sticking to plaques. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. DOI: 10.1111/jth.14201.
- Bye, A. P.; Unsworth, A. J.; Desborough, M. J.; Hildyard, C. A. T.; Appleby, N.; Bruce, D. et al. (2017): Severe platelet dysfunction in NHL patients receiving ibrutinib is absent in patients receiving acalabrutinib. In: *Blood advances* 1 (26), S. 2610–2623. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017011999.
- Bye, A. P.; Unsworth, A. J.; Vaiyapuri, S.; Stainer, A. R.; Fry, M. J.; Gibbins, J. M. (2015): Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35 (11), S. 2326–2335. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306130.
- Byrd, J. C.; Furman, R. R.; Coutre, S. E.; Burger, J. A.; Blum, K. A.; Coleman, M. et al. (2015a): Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. In: *Blood* 125 (16), S. 2497–2506. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606038.
- Byrd, J. C.; Harrington, B.; O'Brien, S.; Jones, J. A.; Schuh, A.; Devereux, S. et al. (2015b): Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 374 (4), S. 323–332. DOI: 10.1056/NEJMoa1509981.
- Byrd, John C.; Furman, Richard R.; Coutre, Steven E.; Flinn, Ian W.; Burger, Jan A.; Blum, Kristie A. et al. (2013): Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. In: *The New England journal of medicine* 369 (1), S. 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637.
- CALQUENCE (2017): Full prescribing information.
- Celi, A.; Pellegrini, G.; Lorenzet, R.; Blasi, A. de; Ready, N.; Furie, B. C.; Furie, B. (1994): P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (19), S. 8767–8771. DOI: 10.1073/pnas.91.19.8767.
- Chang, B. Y.; Huang, M. M.; Francesco, M.; Chen, J.; Sokolove, J.; Magadala, P. et al. (2011): The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. In: *Arthritis research & therapy* 13 (4), R115. DOI: 10.1186/ar3400.
- Chen, J.; Kinoshita, T.; Gururaja, T.; Sukbuntherng, J.; James, D.; Lu, D. et al. (2018): The effect of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors on collagen-induced platelet aggregation, BTK, and tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma (TEC). In: *European journal of haematology*. DOI: 10.1111/ejh.13148.

- Clancy, R.; El Bannoudi, H.; Rasmussen, S. E.; Bornkamp, N.; Allen, N.; Dann, R. et al. (2019): Human low-affinity IgG receptor FcγRIIA polymorphism H131R associates with subclinical atherosclerosis and increased platelet activity in systemic lupus erythematosus. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 17 (3), S. 532–537. DOI: 10.1111/jth.14385.
- Crawford, J. J.; Johnson, A. R.; Misner, D. L.; Belmont, L. D.; Castanedo, G.; Choy, R. et al. (2018): Discovery of GDC-0853: A Potent, Selective, and Noncovalent Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor in Early Clinical Development. In: *Journal of medicinal chemistry* 61 (6), S. 2227–2245. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01712.
- Cuker, A.; Gimotty, P. A.; Crowther, M. A.; Warkentin, T. E. (2012): Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. In: *Blood* 120 (20), S. 4160–4167. DOI: 10.1182/blood-2012-07-443051.
- Daëron, M. (1997): Fc receptor biology. In: *Annual review of immunology* 15, S. 203–234. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.203.
- Denzinger, V.; Busygina, K.; Jamasbi, J.; Pekrul, I.; Spannagl, M.; Weber, C. et al. (2019): Optimizing Platelet GPVI Inhibition versus Haemostatic Impairment by the Btk Inhibitors Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 and Evobrutinib. In: *Thrombosis and haemostasis* 119 (3), S. 397–406. DOI: 10.1055/s-0039-1677744.
- Dispenza, M. C.; Regan, J. A.; Bochner, B. S. (2017): Potential applications of Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the prevention of allergic reactions. In: *Expert review of clinical immunology* 13 (10), S. 921–923. DOI: 10.1080/1744666X.2017.1370374.
- Eke, S.; May, S. K. (2018): Heparin-Induced Thrombocytopenia Workup. Online verfügbar unter <https://emedicine.medscape.com/article/1357846-workup#c9>.
- Elalamy, I.; Galea, V.; Hatmi, M.; Gerotziafas, G. T. (2009): Heparin-induced multiple electrode aggregometry: a potential tool for improvement of heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 (11), S. 1932–1934. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03600.x.
- Fallon, A. M.; Marzec, U. M.; Hanson, S. R.; Yoganathan, A. P. (2007): Thrombin formation in vitro in response to shear-induced activation of platelets. In: *Thrombosis research* 121 (3), S. 397–406. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.04.006.
- Fathi, M. (2018): Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Identification and treatment pathways. In: *Global cardiology science & practice* 2018 (2), S. 15. DOI: 10.21542/gcsp.2018.15.
- Favaloro, E. J. (2008): Clinical utility of the PFA-100. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 34 (8), S. 709–733. DOI: 10.1055/s-0029-1145254.
- Favaloro, E. J.; Bonar, R. (2018): An update on quality control for the PFA-100/PFA-200. In: *Platelets* 29 (6), S. 622–627. DOI: 10.1080/09537104.2018.1475636.
- Favaloro, E. J.; McCaughan, G.; Mohammed, S.; Lau, K. K. E.; Gemmell, R.; Cavanaugh, L. et al. (2018): HIT or miss? A comprehensive contemporary investigation of laboratory tests for heparin induced thrombocytopenia. In: *Pathology* 50 (4), S. 426–436. DOI: 10.1016/j.pathol.2017.11.089.

- Feist, E.; Egerer, K.; Burmester, G-R (2007): Autoantikörperprofile bei der rheumatoiden Arthritis. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 66 (3), 212-4, 216-8. DOI: 10.1007/s00393-007-0159-3.
- Fiedler, K.; Sindrilaru, A.; Terszowski, G.; Kokai, E.; Feyerabend, T. B.; Bullinger, L. et al. (2011): Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. In: *Blood* 117 (4), S. 1329–1339. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281170.
- Fridman, W. H. (1991): Fc receptors and immunoglobulin binding factors. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (12), S. 2684–2690. DOI: 10.1096/fasebj.5.12.1916092.
- Futatani, T.; Watanabe, C.; Baba, Y.; Tsukada, S.; Ochs, H. D. (2001): Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. In: *British journal of haematology* 114 (1), S. 141–149. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02905.x.
- Futosi, K.; Fodor, S.; Mócsai, A. (2013): Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. In: *International immunopharmacology* 17 (4), S. 1185–1197. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.11.010.
- Gabbianelli, R.; Falcioni, G.; Dow, C. S.; Vince, F. P.; Swoboda, B. (2003): A new method to evaluate spontaneous platelet aggregation in type 2 diabetes by Cellfacts. In: *Clinica Chimica Acta* 329 (1-2), S. 95–102. DOI: 10.1016/S0009-8981(03)00012-3.
- Galea, V.; Khaterchi, A.; Robert, F.; Gerotziafas, G.; Hatmi, M.; Elalamy, I. (2013): Heparin-induced multiple electrode aggregometry is a promising and useful functional tool for heparin-induced thrombocytopenia diagnosis: confirmation in a prospective study. In: *Platelets* 24 (6), S. 441–447. DOI: 10.3109/09537104.2012.724736.
- Garcia, A.; Quinton, T. M.; Dorsam, R. T.; Kunapuli, S. P. (2005): Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. In: *Blood* 106 (10), S. 3410–3414. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1933.
- Gillooly, K. M.; Pulicicchio, C.; Pattoli, M. A.; Cheng, L.; Skala, S.; Heimrich, E. M. et al. (2017): Bruton's tyrosine kinase inhibitor BMS-986142 in experimental models of rheumatoid arthritis enhances efficacy of agents representing clinical standard-of-care. In: *PloS one* 12 (7), e0181782. DOI: 10.1371/journal.pone.0181782.
- Gollomp, K.; Kim, M.; Johnston, I.; Hayes, V.; Welsh, J.; Arepally, G. M. et al. (2018): Neutrophil accumulation and NET release contribute to thrombosis in HIT. In: *JCI insight* 3 (18). DOI: 10.1172/jci.insight.99445.
- Greinacher, A. (2015a): CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia. In: *The New England journal of medicine* 373 (3), S. 252–261. DOI: 10.1056/NEJMc1411910.
- Greinacher, A. (2015b): Heparin-Induced Thrombocytopenia. In: *The New England journal of medicine* 373 (19), S. 1883–1884. DOI: 10.1056/NEJMc1510993.

- Gremmel, T.; Calatzis, A.; Steiner, S.; Kaider, A.; Seidinger, D.; Koppensteiner, R. et al. (2010): Is TRAP-6 suitable as a positive control for platelet reactivity when assessing response to clopidogrel? In: *Platelets* 21 (7), S. 515–521. DOI: 10.3109/09537104.2010.493587.
- Greten, H.; Rinninger, F.; Greten, T. F.; Amling, M. (Hg.) (2010): Innere Medizin. 395 Tabellen. 13., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Guilliams, M.; Bruhns, P.; Saeys, Y.; Hammad, H.; Lambrecht, B. N. (2014): The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (2), S. 94–108. DOI: 10.1038/nri3582.
- Hara, K.; Omori, K.; Sumioka, Y.; Aso, Y. (2012): Spontaneous platelet aggregation evaluated by laser light scatter in patients with type 2 diabetes: effects of short-term improved glycemic control and adiponectin. In: *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 159 (1), S. 15–24. DOI: 10.1016/j.trsl.2011.07.007.
- Herman, A. E.; Chinn, L. W.; Kotwal, S. G.; Murray, E. R.; Zhao, R.; Florero, M. et al. (2018): Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics in Healthy Volunteers Treated With GDC-0853, a Selective Reversible Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 103 (6), S. 1020–1028. DOI: 10.1002/cpt.1056.
- Herter, J. M.; Margraf, A.; Volmering, S.; Correia, B. E.; Bradshaw, J. M.; Bisconte, A. et al. (2018): PRN473, an inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, inhibits neutrophil recruitment via inhibition of macrophage antigen-1 signalling. In: *British journal of pharmacology* 175 (3), S. 429–439. DOI: 10.1111/bph.14090.
- Hick, C.; Hick, A. (2013): Mediscript Kurzlehrbuch Physiologie. 7. Aufl. München: Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://institut.elsevierelibrary.de/product/mediscript-kurzlehrbuch-physiologie-7-auf1#UrLNV1PgSVo>.
- Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Shaughnessy, S. G.; Anand, S. S.; Halperin, J. L.; Raschke, R. et al. (2001): Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. In: *Chest* 119 (1 Suppl), 64S–94S. DOI: 10.1378/chest.119.1_suppl.64s.
- Honigberg, L. A.; Smith, A. M.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Loury, D.; Chang, B. et al. (2010): The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (29), S. 13075–13080. DOI: 10.1073/pnas.1004594107.
- Huang, Z.; Chien, P.; Indik, Z. K.; Schreiber, A. D. (2011): Human platelet FcγRIIA and phagocytes in immune-complex clearance. In: *Molecular immunology* 48 (4), S. 691–696. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.11.017.
- Ibrahim, S. F.; van den Engh, G. (2007): Flow cytometry and cell sorting. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 106, S. 19–39. DOI: 10.1007/10_2007_073.
- IMBRUVICA (2018): Highlights of prescribing information.

- Indik, Z. K.; Salehuddin, M.; McKenzie, S. E.; Kelly, C.; Levinson, A. I.; Schreiber, A. D. (1992): Human Fc gamma RII: the structure of the Fc gamma RII cytosolic domain governs phagocytic function. In: *Transactions of the Association of American Physicians* 105, S. 214–221.
- Ingegnoli, F.; Castelli, R.; Gualtierotti, R. (2013): Rheumatoid factors: clinical applications. In: *Disease markers* 35 (6), S. 727–734. DOI: 10.1155/2013/726598.
- Ingerman, C. M.; Smith, J. B.; Silver, M. J. (1979): Direct measurement of platelet secretion in whole blood. In: *Thrombosis research* 16 (3-4), S. 335–344. DOI: 10.1016/0049-3848(79)90081-1.
- Isakov, N. (1997): Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. In: *Journal of leukocyte biology* 61 (1), S. 6–16. DOI: 10.1002/jlb.61.1.6.
- Jenkins, C. S.; Phillips, D. R.; Clemetson, K. J.; Meyer, D.; Larrieu, M. J.; Lüscher, E. F. (1976): Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. Studies of the proteins on platelets from patients with Bernard-Soulier syndrome and von Willebrand's disease. In: *The Journal of clinical investigation* 57 (1), S. 112–124. DOI: 10.1172/JCI108251.
- Jin, J.; Baker, S. A.; Hall, E. T.; Gombar, S.; Bao, A.; Zehnder, J. L. (2019): Implementation of Whole-Blood Impedance Aggregometry for Heparin-Induced Thrombocytopenia Functional Assay and Case Discussion. In: *American journal of clinical pathology* 152 (1), S. 50–58. DOI: 10.1093/ajcp/aqz013.
- Jong, J. de; Sukbuntherng, J.; Skee, D.; Murphy, J.; O'Brien, S.; Byrd, J. C. et al. (2015): The effect of food on the pharmacokinetics of oral ibrutinib in healthy participants and patients with chronic lymphocytic leukemia. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 75 (5), S. 907–916. DOI: 10.1007/s00280-015-2708-9.
- Jurk, K.; Kehrel, B. E. (2010): Thrombozytensekretion. In: B. Pötzsch und K. Madlener (Hg.): *Hämostaseologie*. 2., vollständig aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 67–72.
- Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S. et al. (1998): A dual thrombin receptor system for platelet activation. In: *Nature* 394 (6694), S. 690–694. DOI: 10.1038/29325.
- Kamel, S.; Horton, L.; Ysebaert, L.; Levade, M.; Burbury, K.; Tan, S. et al. (2015): Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. In: *Leukemia* 29 (4), S. 783–787. DOI: 10.1038/leu.2014.247.
- Kasmeridis, C.; Apostolakis, S.; Lip, G. Y. H. (2013): Aspirin and aspirin resistance in coronary artery disease. In: *Current opinion in pharmacology* 13 (2), S. 242–250. DOI: 10.1016/j.coph.2012.12.004.
- Katewa, A.; Wang, Y.; Hackney, J. A.; Huang, T.; Suto, E.; Ramamoorthi, N. et al. (2017): Btk-specific inhibition blocks pathogenic plasma cell signatures and myeloid cell-associated damage in IFN α -driven lupus nephritis. In: *JCI insight* 2 (7), e90111. DOI: 10.1172/jci.insight.90111.

- Kazianka, L.; Drucker, C.; Skrabs, C.; Thomas, W.; Melchardt, T.; Struve, S. et al. (2017): Ristocetin-induced platelet aggregation for monitoring of bleeding tendency in CLL treated with ibrutinib. In: *Leukemia* 31 (5), S. 1117–1122. DOI: 10.1038/leu.2016.316.
- Kelton, J. G.; Sheridan, D.; Santos, A.; Smith, J.; Steeves, K.; Smith, C. et al. (1988): Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. In: *Blood* 72 (3), S. 925–930.
- Klinke, R.; Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagl, S. (2010): Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Langrish, C. L.; Bradshaw, J. M.; Owens, T. D.; Campbell, R. L.; Francesco, M. R.; Karr, D. E. et al. (2017): PRN1008, a Reversible Covalent BTK Inhibitor in Clinical Development for Immune Thrombocytopenic Purpura. In: *Blood*.
- Laster, J.; Cikrit, D.; Walker, N.; Silver, D. (1987): The heparin-induced thrombocytopenia syndrome: an update. In: *Surgery* 102 (4), S. 763–770.
- Lee, R. H.; Bergmeier, W. (2016): Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemITAM signaling and vascular integrity in inflammation and development. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 14 (4), S. 645–654. DOI: 10.1111/jth.13250.
- Levade, M.; David, E.; Garcia, C.; Laurent, P.; Cadot, S.; Michallet, A. et al. (2014): Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. In: *Blood* 124 (26), S. 3991–3995. DOI: 10.1182/blood-2014-06-583294.
- Liang, C.; Tian, D.; Ren, X.; Ding, S.; Jia, M.; Xin, M.; Thareja, S. (2018): The development of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors from 2012 to 2017: A mini-review. In: *European journal of medicinal chemistry* 151, S. 315–326. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.062.
- Lipsky, A. H.; Farooqui, M. Z. H.; Tian, X.; Martyr, S.; Cullinane, A. M.; Nghiem, K. et al. (2015): Incidence and risk factors of bleeding-related adverse events in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. In: *Haematologica* 100 (12), S. 1571–1578. DOI: 10.3324/haematol.2015.126672.
- Lisman, T. (2018): Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. In: *Cell and tissue research* 371 (3), S. 567–576. DOI: 10.1007/s00441-017-2727-4.
- Liu, J.; Fitzgerald, M. E.; Berndt, M. C.; Jackson, C. W.; Gartner, T. K. (2006): Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIIb-dependent thrombus formation in vivo. In: *Blood* 108 (8), S. 2596–2603. DOI: 10.1182/blood-2006-01-011817.
- Liu, J.; Pestina, T. I.; Berndt, M. C.; Steward, S. A.; Jackson, C. W.; Gartner, T. K. (2004): The roles of ADP and TXA in botrocetin/VWF-induced aggregation of washed platelets. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2 (12), S. 2213–2222. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2004.01023.x.
- Look, K. A.; Sahud, M.; Flaherty, S.; Zehnder, J. L. (1997): Heparin-induced Platelet Aggregation Vs Platelet Factor 4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis of Heparin-induced Thrombocytopenia-Thrombosis. In: *American journal of clinical pathology* 108 (1), S. 78–82. DOI: 10.1093/ajcp/108.1.78.

- Lorenz, R.; Siess, W.; Weber, P. C. (1981): Effects of very low versus standard dose acetyl salicylic acid, dipyridamole and sulfinpyrazone on platelet function and thromboxane formation in man. In: *European Journal of Pharmacology* 70 (4), S. 511–518. DOI: 10.1016/0014-2999(81)90362-9.
- Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.; Hein, L. (2016): Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Markham, A.; Dhillon, S. (2018): Acalabrutinib: First Global Approval. In: *Drugs* 78 (1), S. 139–145. DOI: 10.1007/s40265-017-0852-8.
- Martel, N.; Lee, J.; Wells, P. S. (2005): Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. In: *Blood* 106 (8), S. 2710–2715. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1546.
- Martin, M. U.; Resch, K. (2009): Immunologie. 1. Aufl. Stuttgart: UTB (UTB basics, 3174). Online verfügbar unter <http://www.utb-studi-e-book.de/9783838531748>.
- Mazurov, A. V.; Khaspekova, S. G.; Yakushkin, V. V.; Khachikyan, M. V.; Zyuryaev, I. T.; Ruda, M. Ya. (2013): Spontaneous Platelet Aggregation in Patients with Acute Coronary Syndrome. In: *Bull Exp Biol Med* 155 (1), S. 89–91. DOI: 10.1007/s10517-013-2087-3.
- McKenzie, S. E.; Sachais, B. S. (2014): Advances in the pathophysiology and treatment of heparin-induced thrombocytopenia. In: *Current opinion in hematology* 21 (5), S. 380–387. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000066.
- Minet, V.; Dogné, J.; Mullier, F. (2017): Functional Assays in the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Review. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (4). DOI: 10.3390/molecules22040617.
- Mohamed, A. J.; Yu, L.; Bäckesjö, C.; Vargas, L.; Faryal, R.; Aints, A. et al. (2009): Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. In: *Immunological reviews* 228 (1), S. 58–73. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00741.x.
- Montalban, X.; Arnold, D. L.; Weber, M. S.; Staikov, I.; Piasecka-Stryczynska, K.; Willmer, J. et al. (2019): Placebo-Controlled Trial of an Oral BTK Inhibitor in Multiple Sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 380 (25), S. 2406–2417. DOI: 10.1056/NEJMoa1901981.
- Morel-Kopp, M.-C.; Aboud, M.; Tan, C. W.; Kulathilake, C.; Ward, C. (2010): Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies. In: *Thrombosis research* 125 (5), e234-9. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.12.001.
- Morel-Kopp, M.-C.; Tan, C. W.; Brighton, T. A.; McRae, S.; Baker, R.; Tran, H. et al. (2012): Validation of whole blood impedance aggregometry as a new diagnostic tool for HIT: results of a large Australian study. In: *Thrombosis and haemostasis* 107 (3), S. 575–583. DOI: 10.1160/TH11-09-0631.
- Morel-Kopp, M.-C.; Mullier, F.; Gkalea, V.; Bakchoul, T.; Minet, V.; Elalamy, I.; Ward, C. M. (2016): Heparin-induced multi-electrode aggregometry method for heparin-induced thrombocytopenia testing: communication from the SSC of the ISTH. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 14 (12), S. 2548–2552. DOI: 10.1111/jth.13516.

- Moroi, A. J.; Watson, S. P. (2015): Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. In: *Biochemical pharmacology* 94 (3), S. 186–194. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.02.004.
- Nicolson, P. L. R.; Hughes, C. E.; Watson, S.; Nock, S. H.; Hardy, A. T.; Watson, C. N. et al. (2018): Inhibition of Btk by Btk-specific concentrations of ibrutinib and acalabrutinib delays but does not block platelet aggregation mediated by glycoprotein VI. In: *Haematologica* 103 (12), S. 2097–2108. DOI: 10.3324/haematol.2018.193391.
- Ochs, H. D.; Smith, C. I. (1996): X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. In: *Medicine* 75 (6), S. 287–299. DOI: 10.1097/00005792-199611000-00001.
- Oda, A.; Ikeda, Y.; Ochs, H. D.; Druker, B. J.; Ozaki, K.; Handa, M. et al. (2000): Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. In: *Blood* 95 (5), S. 1663–1670.
- Pain, S.; Falet, H.; Saci, A.; Bachelot-Loza, C.; Rendu, F. (2000): Tyrosine phosphorylation and association of FcγRII and p72Syk are not limited to the FcγRII signalling pathway. In: *Cellular signalling* 12 (3), S. 165–171. DOI: 10.1016/S0898-6568(99)00079-0.
- Pan, Z.; Scheerens, H.; Li, S.; Schultz, B. E.; Sprengeler, P. A.; Burrill, L. C. et al. (2007): Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. In: *ChemMedChem* 2 (1), S. 58–61. DOI: 10.1002/cmdc.200600221.
- Perdomo, J.; Leung, H. H. L.; Ahmadi, Z.; Yan, F.; Chong, J. J. H.; Passam, F. H.; Chong, B. H. (2019): Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. In: *Nature communications* 10 (1), S. 1322. DOI: 10.1038/s41467-019-09160-7.
- Pillai, V. G.; Bao, J.; Zander, C. B.; McDaniel, J. K.; Chetty, P. S.; Seeholzer, S. H. et al. (2016): Human neutrophil peptides inhibit cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13: a potential link of inflammation to TTP. In: *Blood* 128 (1), S. 110–119. DOI: 10.1182/blood-2015-12-688747.
- Possinger, K.; Regierer, A. C. (2011): Facharzt Hämatologie Onkologie. 2. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Nachschlagewerke. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=807992>.
- Pouplard, C.; Lochmann, S.; Renard, B.; Herault, O.; Colombat, P.; Amiral, J.; Gruel, Y. (2001): Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. In: *Blood* 97 (10), S. 3300–3302. DOI: 10.1182/blood.v97.10.3300.
- Qi, R.; Ozaki, Y.; Kuroda, K.; Asazuma, N.; Yatomi, Y.; Satoh, K. et al. (1996): Differential activation of human platelets induced by Fc gamma receptor II cross-linking and by anti-CD9 monoclonal antibody. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (12), S. 5638–5645.

- Qiao, J.; Al-Tamimi, M.; Baker, R. I.; Andrews, R. K.; Gardiner, E. E. (2015): The platelet Fc receptor, FcγRIIa. In: *Immunological reviews* 268 (1), S. 241–252. DOI: 10.1111/imr.12370.
- Quek, L. S.; Bolen, J.; Watson, S. P. (1998): A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. In: *Current Biology* 8 (20), 1137–S1. DOI: 10.1016/S0960-9822(98)70471-3.
- Raffael, A. (1988): Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. In: *Labor-Medizin* (11), S. 89–97.
- Rauova, L.; Poncz, M.; McKenzie, S. E.; Reilly, M. P.; Arepally, G.; Weisel, J. W. et al. (2005): Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. In: *Blood* 105 (1), S. 131–138. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1544.
- Reichl, F.-X.; Mohr, K.; Hein, L.; Hickel, R. (2014): Atlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner. 2. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG.
- Reilly, M. P.; Sinha, U.; André, P.; Taylor, S. M.; Pak, Y.; Deguzman, F. R. et al. (2011): PRT-060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse model. In: *Blood* 117 (7), S. 2241–2246. DOI: 10.1182/blood-2010-03-274969.
- Reilly, M. P.; Taylor, S. M.; Hartman, N. K.; Arepally, G. M.; Sachais, B. S.; Cines, D. B. et al. (2001): Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA. In: *Blood* 98 (8), S. 2442–2447. DOI: 10.1182/blood.v98.8.2442.
- Ren, L.; Campbell, A.; Fang, H.; Gautam, S.; Elavazhagan, S.; Fatehchand, K. et al. (2016): Analysis of the Effects of the Bruton's tyrosine kinase (Btk) Inhibitor Ibrutinib on Monocyte Fcγ Receptor (FcγR) Function. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (6), S. 3043–3052. DOI: 10.1074/jbc.M115.687251.
- Rigg, R. A.; Aslan, J. E.; Healy, L. D.; Wallisch, M.; Thierheimer, M. L. D.; Loren, C. P. et al. (2016): Oral administration of Bruton's tyrosine kinase inhibitors impairs GPVI-mediated platelet function. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 310 (5), C373–80. DOI: 10.1152/ajpcell.00325.2015.
- Rollin, J.; Pouplard, C.; Gruel, Y. (2016): Risk factors for heparin-induced thrombocytopenia: Focus on Fcγ receptors. In: *Thrombosis and haemostasis* 116 (5), S. 799–805. DOI: 10.1160/TH16-02-0109.
- Rosenfeld, S. I.; Looney, R. J.; Leddy, J. P.; Phipps, D. C.; Abraham, G. N.; Anderson, C. L. (1985): Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. In: *The Journal of clinical investigation* 76 (6), S. 2317–2322. DOI: 10.1172/JCI112242.
- Schneider, M.; Baseler, G.; Funken, O.; Heberger, S.; Kiltz, U.; Klose, P. et al. (2019): Interdisziplinäre Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-002I_S3_Fruehe_Rheumatoide-Arthritis-Management_2019-12_01.pdf, zuletzt geprüft am 04.04.2020.

- Selleng, K.; Schütt, A.; Selleng, S.; Warkentin, T. E.; Greinacher, A. (2010): Studies of the anti-platelet factor 4/heparin immune response: adapting the enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of memory B cells against complex antigens. In: *Transfusion* 50 (1), S. 32–39. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02360.x.
- Shatzel, J. J.; Olson, S. R.; Tao, D. L.; McCarty, O. J. T.; Danilov, A. V.; DeLoughery, T. G. (2017): Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 15 (5), S. 835–847. DOI: 10.1111/jth.13651.
- Siess, W. (1989): Molecular mechanisms of platelet activation. In: *Physiological reviews* 69 (1), S. 58–178. DOI: 10.1152/physrev.1989.69.1.58.
- Slavik, L.; Svobodova, G.; Ulehlova, J.; Krcova, V.; Hlusi, A.; Prochazkova, J.; Hutyra, M. (2015): Polymorphism of the Fcγ Receptor II as a Possible Predisposing Factor for Heparin-Induced Thrombocytopenia. In: *Clinical laboratory* 61 (8), S. 1027–1032. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.141207.
- Smirnova, D. V.; Ugarova, N. N. (2017): Firefly Luciferase-based Fusion Proteins and their Applications in Bioanalysis. In: *Photochemistry and photobiology* 93 (2), S. 436–447. DOI: 10.1111/php.12656.
- Smith, P. F.; Krishnarajah, J.; Nunn, P. A.; Hill, R. J.; Karr, D.; Tam, D. et al. (2017): A phase I trial of PRN1008, a novel reversible covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, in healthy volunteers. In: *British journal of clinical pharmacology* 83 (11), S. 2367–2376. DOI: 10.1111/bcp.13351.
- Stalker, T. J.; Newman, D. K.; Ma, P.; Wannemacher, K. M.; Brass, L. F. (2012): Platelet signaling. In: *Handbook of experimental pharmacology* (210), S. 59–85. DOI: 10.1007/978-3-642-29423-5_3.
- Tam, C.; Grigg, A. P.; Opat, S.; Ku, M.; Gilbertson, M.; Anderson, M. A. et al. (2015): The BTK Inhibitor, Bgb-3111, Is Safe, Tolerable, and Highly Active in Patients with Relapsed/ Refractory B-Cell Malignancies: Initial Report of a Phase 1 First-in-Human Trial. In: *Blood*.
- Tam, C. S.; Trotman, J.; Opat, S.; Burger, J. A.; Cull, G.; Gottlieb, D. et al. (2019): Phase 1 study of the selective BTK inhibitor zanubrutinib in B-cell malignancies and safety and efficacy evaluation in CLL. In: *Blood* 134 (11), S. 851–859. DOI: 10.1182/blood.2019001160.
- Thomas, M. R.; Storey, R. F. (2015): The role of platelets in inflammation. In: *Thrombosis and haemostasis* 114 (3), S. 449–458. DOI: 10.1160/TH14-12-1067.
- Tóth, O.; Calatzis, A.; Penz, S.; Losonczy, H.; Siess, W. (2006): Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. In: *Thrombosis and haemostasis* 96 (12), S. 781–788. DOI: 10.1160/TH06-05-0242.
- Trip, M. D.; Cats, V. M.; van Capelle, F. J.; Vreeken, J. (1990): Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. In: *The New England journal of medicine* 322 (22), S. 1549–1554. DOI: 10.1056/NEJM199005313222201.

- Trist, H. M.; Tan, P. S.; Wines, B. D.; Ramsland, P. A.; Orlowski, E.; Stubbs, J. et al. (2014): Polymorphisms and interspecies differences of the activating and inhibitory FcγRII of *Macaca nemestrina* influence the binding of human IgG subclasses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (2), S. 792–803. DOI: 10.4049/jimmunol.1301554.
- Tucker, D. L.; Rule, S. A. (2015): A critical appraisal of ibrutinib in the treatment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. In: *Therapeutics and clinical risk management* 11, S. 979–990. DOI: 10.2147/TCRM.S73559.
- Tutwiler, V.; Madeeva, D.; Ahn, H. S.; Andrianova, I.; Hayes, V.; Zheng, X. L. et al. (2016): Platelet transactivation by monocytes promotes thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. In: *Blood* 127 (4), S. 464–472. DOI: 10.1182/blood-2013-11-539262.
- Versteeg, H. H.; Heemskerk, J. W. M.; Levi, M.; Reitsma, P. H. (2013): New fundamentals in hemostasis. In: *Physiological reviews* 93 (1), S. 327–358. DOI: 10.1152/physrev.00016.2011.
- Vieira, J.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. (2012): Advances in the knowledge of light emission by firefly luciferin and oxyluciferin. In: *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 117, S. 33–39. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.017.
- Vries, R. de; Smit, J. W.; Hellemans, P.; Jiao, J.; Murphy, J.; Skee, D. et al. (2016): Stable isotope-labelled intravenous microdose for absolute bioavailability and effect of grapefruit juice on ibrutinib in healthy adults. In: *British journal of clinical pharmacology* 81 (2), S. 235–245. DOI: 10.1111/bcp.12787.
- Walenga, J. M.; Frenkel, E. P.; Bick, R. L. (2003): Heparin-induced thrombocytopenia, paradoxical thromboembolism, and other adverse effects of heparin-type therapy. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 17 (1), S. 259–282. DOI: 10.1016/S0889-8588(02)00088-6.
- Walter, H. S.; Rule, S. A.; Dyer, M. J. S.; Karlin, L.; Jones, C.; Cazin, B. et al. (2016): A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. In: *Blood* 127 (4), S. 411–419. DOI: 10.1182/blood-2015-08-664086.
- Wang, M. L.; Blum, K. A.; Martin, P.; Goy, A.; Auer, R.; Kahl, B. S. et al. (2015): Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. In: *Blood* 126 (6), S. 739–745. DOI: 10.1182/blood-2015-03-635326.
- Warkentin, T. E.; Hayward, C. P.; Boshkov, L. K.; Santos, A. V.; Sheppard, J. A.; Bode, A. P.; Kelton, J. G. (1994): Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. In: *Blood* 84 (11), S. 3691–3699.
- Warkentin, T. E.; Hayward, C. P.; Smith, C. A.; Kelly, P. M.; Kelton, J. G. (1992): Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 120 (3), S. 371–379.

- Warkentin, T. E.; Levine, M. N.; Hirsh, J.; Horsewood, P.; Roberts, R. S.; Gent, M.; Kelton, J. G. (1995): Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. In: *The New England journal of medicine* 332 (20), S. 1330–1335. DOI: 10.1056/NEJM199505183322003.
- Warkentin, T. E.; Pai, M.; Linkins, L. A. (2017): Direct oral anticoagulants for treatment of HIT: update of Hamilton experience and literature review. In: *Blood* 130 (9), S. 1104–1113. DOI: 10.1182/blood-2017-04-778993.
- Warmerdam, P. A.; van de Winkel, J. G.; Gosselin, E. J.; Capel, P. J. (1990): Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD32). In: *The Journal of experimental medicine* 172 (1), S. 19–25. DOI: 10.1084/jem.172.1.19.
- Watson, S. P.; Herbert, J. M. J.; Pollitt, A. Y. (2010): GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 8 (7), S. 1456–1467. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03875.x.
- Wilkerson, M. J. (2012): Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 42 (1), S. 53–71. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.09.012.
- Worthington, R. E.; Carroll, R. C.; Boucheix, C. (1990): Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor. In: *British journal of haematology* 74 (2), S. 216–222. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb02568.x.
- Wu, J.; Liu, C.; Tsui, S. T.; Liu, D. (2016a): Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. In: *Journal of hematology & oncology* 9 (1), S. 80. DOI: 10.1186/s13045-016-0313-y.
- Wu, J.; Zhang, M.; Liu, D. (2016b): Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. In: *Journal of hematology & oncology* 9, S. 21. DOI: 10.1186/s13045-016-0250-9.
- Yasuhiro, T.; Sawada, W.; Klein, C.; Kozaki, R.; Hotta, S.; Yoshizawa, T. (2017): Anti-tumor efficacy study of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ONO/GS-4059, in combination with the glycoengineered type II anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) demonstrates superior in vivo efficacy compared to ONO/GS-4059 in combination with rituximab. In: *Leukemia & lymphoma* 58 (3), S. 699–707. DOI: 10.1080/10428194.2016.1201567.
- Zhi, H.; Rauova, L.; Hayes, V.; Gao, C.; Boylan, B.; Newman, D. K. et al. (2013): Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. In: *Blood* 121 (10), S. 1858–1867. DOI: 10.1182/blood-2012-07-443325.
- Zhu, J.; Li, J.; Zou, J.; Song, Y.; Qi, J.; Xu, W. et al. (2017): BGB-3111, a Highly Specific BTK Inhibitor, Is Well Tolerated and Highly Active in Chinese Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies: Initial Report of a Phase 1 Trial in China. Online verfügbar unter http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/5347, zuletzt geprüft am 30.08.2019.

Abkürzungen

A

AA	Arachidonsäure (<i>arachidonic acid</i>)
Abb.	Abbildung
Aca	Acalabrutinib
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>aggregation unit</i>

B

BGB-3111	Zanubrutinib
Btk	Brutons Tyrosin Kinase
BTKi	Btk-Inhibitor/en

C

cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD62P	P-Selektin
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
COX-1	Cyclooxygenase 1
CRP	<i>collagen-related peptide</i>

D

DOAC	Direkte orale Antikoagulanzen
------	-------------------------------

E

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELIspot	<i>Enzyme-linked Immuno Spot Assay</i>
Evo	Evobrutinib

F

Fab2	Antigen-bindendes F(ab) ₂ -Fragment eines Antikörpers
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , Fc-Teil eines Antikörpers
fig.	<i>Figure</i>

FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
Fv	variable Region eines IgG
G	
GAG	Glykosaminoglykan
GDC-0853	Fenebrutinib
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H	
H	Heparin
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
I	
Ibr	Ibrutinib
IgA	Immunglobin A
IgG	Immunglobin G
IP ₃	Inositoltrisphosphat
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
L	
LAT	<i>Linker of activated T-cells</i>
LMWH	Niedermolekulares Heparin
M	
MCL	Mantelzelllymphom
MEA	<i>Multiple electrode aggregometry</i>
min.	Minute
MW	Mittelwert
N	
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neutrophile extrazelluläre Traps
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
O	
ONO/GS-4059	Tirabrutinib
P	
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PF4	Plättchenfaktor 4
PFA-200	<i>platelet function analyzer-200</i>
PH	Pleckstrin Homologie
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP ₂	Phosphatidylinositbisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinosittrisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase Cβ
PLCγ2	Phospholipase Cγ2
PRP	Plättchen reiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PTFE	<i>Poly-tetra-fluoro-ethylene</i>
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
R	
R	Rezeptor
RA	Rheumatische Arthritis
RF	Rheumafaktor
S	
SD	<i>standard deviation</i>
SH	Src-Homologie
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPA	Spontanaggregation
SRA	<i>Serotonin-Release-Assay</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
T	
Tab.	Tabelle
Tec	<i>Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Thromboxan-Rezeptor
TRAP-6	Thrombin-Rezeptor-aktivierende Peptid 6

TxA2 Thromboxan-A2

U

UFH Unfraktioniertes Heparin

V

VKA Vitamin-K-Antagonisten

vWF von-Willebrand-Faktor

X

XLA *hereditary X-linked agammaglobulinemia*, Bruton-Syndrom

XID *X-linked immunodeficiency*

Publikation im Rahmen dieser Dissertation

L. Goldmann, R. Duan, T. Kragh, G. Wittmann, C. Weber, R. Lorenz, P. von Hundelshausen, M. Spannagl, W. Siess (2019)

„Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT?”

Blood Advances 3(23): 4021-4033

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. Siess, meinem Betreuer und Doktorvater, für die Vergabe dieses interessanten Themas, die exzellente Betreuung, die intensive Förderung und Unterstützung der Arbeit und der Publikationen, die fachliche Expertise, sowie für die Geduld bei der Korrektur.

Besonderen Dank auch an Herrn Prof. Dr. R. Lorenz für die statistische Hilfestellung.

Ich bedanke mich bei allen, die zur Publikation im Rahmen dieser Doktorarbeit beigetragen haben: R. Duan für die Unterstützung in der Durchführung der FACS Experimente, Dr. T. Kragh für die Durchführung der PFA-200® Experimente, Herrn Dr. med. G. Wittmann für die Bereitstellung des Patientenserums sowie bei Herrn Prof. Dr. C. Weber, Prof. Dr. M. Spannagl und Dr. P. von Hundelshausen.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Kathrin von Oheimb für die organisatorische Hilfe, technische Assistenz, tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung mancher Experimente und Beantwortung meiner Fragen.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei all den netten und stets zuverlässigen Probanden, ohne deren großzügige Blutspenden diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Luise Goldmann, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Hemmung der Fc-Rezeptor-(FcγRIIA)-Aktivierung auf Thrombozyten durch Btk-Inhibitoren: Eine neue Option für die Behandlung der Heparin-induzierten Thrombozytopenie?

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.04.21

Luise Goldmann